Vol. 9 1938

IMPERIAL BUREAU OF ENTOMOLOGY
20 JULY 1939
INSTITUTE

ARQUIVOS

DO

INSTITUTO BIOLOGICO

SECRETARIA DA AGRICULTURA
SÃO PAULO
BRASIL

Os Arquivos do Instituto Biologico aparecem sob a forma de artigos separados publicados à medida de sua apresentação, os quais anualmente são reunidos em um volume, que pode ser adquirido por permuta ou compra pelo preço marcado na capa.

Os artigos separados, impressos em numero limitado, são obtidos apenas por permuta.

Toda correspondencia referente aos Arquivos deve ser dirigida ao Diretor do Instituto Biologico, Caixa Postal 2821, São Paulo, Brasil.

Diretor - Prof. Dr. H. da Rocha Lima

The "Arquivos do Instituto Biologico" appear in the form of separate articles published as they are presented, and are annually united in one volume, which may be acquired by exchange or purchase at the price indicated on the cover.

The separate articles, a limited number of which is printed, may be obtained by exchange.

All correspondence referring to the "Arquivos" should be addressed to-Diretor do Instituto Biologico, P. O. Box 2821-São Paulo, Brazil.

PREÇO DESTE NUMERO 20$000

Vol. 9 1938

ARQUIVOS

DO

INSTITUTO BIOLOGICO

SECRETARIA DA AGRICULTURA
SÃO PAULO
BRASIL

SUMARIO

Pags.

1. **K. Silberschmidt e M. Kramer** — CONTRIBUIÇÃO PARA O CONHECIMENTO DO MOSAICO DO FUMO E DOS SEUS HOSPEDEIROS SELVAGENS NO BRASIL. — Estampas 1-4.
   Beitrag zur Kenntnis der Mosaik-Krankheit des Tabaks und deren in Brasilien wildwachsenden Wirtspflanzen 1-20

2. **J. Reis e P. Nobrega** — SOBRE AS LESÕES PRODUZIDAS PELA "CAPILLARIA PERFORANS KOTLÁN E OROSZ" NAS AVES DOMESTICAS. — Estampas 5-8.
   On the lesions caused by "Capillaria perforans" Kotlán and Orosz in domesticated birds 21-24

3. **P. E. Galvão e J. Pereira** — SOBRE A OXIDAÇÃO DO ACIDO LACTICO NO ENCEFALO DE ANIMAIS NORMAIS E EM AVITAMINOSE B1. LOCALISAÇÃO DA LESÃO QUIMICA NOS MAMIFEROS E NAS AVES.
   On the oxydation of lactic acid in the brain of animals both normal and in B1 - Avitaminosis. Localisation of the chemical lesion in mammals and birds. 25-37

4. **P. E. Galvão, C. H. Florence e J. Pereira** — MODIFICAÇÃO DO METODO PERMANGANICO-IODOMETRICO PARA A DOSAGEM DO ACIDO LACTICO. — Com 1 figura no texto.
   Modification of the Permanganate-Iodometric Method for the determination of the Lactic acid 39-50

5. **C. J. Drake and E. J. Hambleton** — BRAZILIAN TINGITOIDEA (HEMIPTERA) (PART IV). — With 2 Figures in the Text, and Plates 9-10.
   Tingitoidea do Brasil (Hemiptera) (Parte IV). 51-57

6. **L. Travassos Filho** — CONTRIBUIÇÃO PARA O CONHECIMENTO DOS "EUCHROMIIDAE". III - GENERO "COSMOSOMA HÜBNER, 1827" (LEPIDOPTERA). — Com 16 figuras no texto e estampa 11.
   Contribution to the knowledge of the "Euchromiidae". III - Genus "Cosmosoma HÜBNER, 1827" (Lepidoptera). 59-66

7. **D. M. Cardoso** — SUPRARRENAES, PARATIROIDES E EQUILIBRIO MINERAL.
   Adrenals, parathyroids and mineral metabolism 67-76

8. **P. Nobrega e J. Reis** — VACINAÇÃO CONTRA CÓLERA AVIARIA COM AMOSTRA VIVA (TIPO AZUL) DE "PASTEURELLA AVICIDA".
   Vaccination against fowl cholera with a live sample (blue type) of "Pasteurella avicida" 77-84

9. **E. J. Hambleton** — O PERCEVEJO "HORCIUS NOBILELLUS (BERG)" COMO NOVA PRÁGA DO ALGODOEIRO EM SÃO PAULO. OBSERVAÇÕES PRELIMINARES — Estampas 12-14.
   The plant bug "Horcius nobilellus (BERG)", a new pest of cotton in S. Paulo. — Preliminary observations. 85-92

(CONTINÚA)

Pags.

10. **H. F. G. Sauer** — NOTAS BIOLOGICAS SOBRE "MIMORISTA CAMBOGIALIS (GUEN.)" LEP. PYRAUST. — Com 3 figuras no texto e estampa 15.
Biological notes on "Mimorista cambogialis (GUEN.)", Lep. Pyraust. 93-98

11. **O. Bier** — OBSERVAÇÕES COMPLEMENTARES SOBRE O PAPEL DOS COMPONENTES DA ALEXINA NA REAÇÃO DE WASSERMANN.
Further investigations on the role of the components of the complement in the Wassermann Reaction 99-108

12. **O. Bier & M. Rocha e Silva** — ESTUDOS SOBRE INFLAMAÇÃO.
I - MECANISMO DO AUMENTO DE PERMEABILIDADE CAPILAR NA INFLAMAÇÃO, COM ESPECIAL REFERENCIA AO PAPEL DA HISTAMINA — Com 6 figuras no texto.
Studies on Inflammation. I - Mechanism of increased capillary permeability in inflammation, with special reference to the role of Histamine 109-122

13. **M. Rocha e Silva & O. Bier** — ESTUDOS SOBRE INFLAMAÇÃO.
II - EXPERIENCIAS ADICIONAIS SOBRE A IDENTIDADE DA LEUCOTAXINA DE MENKIN E DA HISTAMINA. — Com 6 figuras no texto.
Studies on inflammation. II - Corroborative Experiments on the identity of Menkin's leucotaxine and histamine. 123-128

14. **M. Rocha e Silva & O. Bier** — ESTUDOS SOBRE INFLAMAÇÃO.
III - DO FACTOR RESPONSAVEL PELO QUIMIOTACTISMO POSITIVO DOS LEUCOCITOS, PRESENTE NOS EXSUDATOS INFLAMATORIOS.
Studies on inflammation. III - Concerning the chemotaxic factor of inflammatory Exudates 129-132

15. **M. Rocha e Silva & O. Bier** — HISTAMINA E FENOMENO DE SHWARTZMAN. — Com 6 figuras no texto.
Histamine and Shwartzman phenomenon 133-143

16. **M. Rocha e Silva** — AÇÃO DA TRIPSINA SOBRE O INTESTINO E UTERO ISOLADOS DE COBAIA; LIBERTAÇÃO DE HISTAMINA DO PULMÃO, PELA PERFUSÃO COM SOLUÇÕES DE TRIPSINA. — Com 10 figuras no texto.
Action of trypsin on smooth muscle. Liberation of histamine from the perfused guinea-pig lung by trypsin. 145-163

17. **P. de Azevedo e L. Canale** — A HIPOFISE E SUA AÇÃO NAS GONADAS DOS PEIXES NEOTROPICOS. — Com 3 figuras no texto e estampa 16.
The pituitary and its action on the gonads of the neotropic fishes. 165-186

18. **H. F. G. Sauer** — INIMIGOS NATURAIS DA "PLATYEDRA GOSSYPIELLA (SAUNDERS)" NO ESTADO DE SÃO PAULO. VESPAS DEPREDADORAS E ESPECIES DE PARASITAS COM NOTAS SOBRE A SUA BIOLOGIA. — Estampas 17-18.
Natural enemies of "Platyedra gossypiella (SAUNDERS)" in the State of São Paulo, Brazil. Depredating wasps and species of parasites with notes on their biology 187-199

(CONTINÚA)

Pags.

19. **E. J. Hambleton** — A OCORRENCIA DO ACARO TROPICAL "TARSONEMUS LATUS BANKS", (ACAR. TARSONEMIDAE). CAUSADOR DA RASGADURA DAS FOLHAS NOS ALGODOAIS DE S. PAULO — Com 3 figuras no texto e estampas 19-23.
The occurence of the tropical mite "Tarsonemus latus BANKS" in cotton fields of São Paulo (Brazil) 201-209

20. **P. de Azevedo** — O CASCUDO DOS AÇUDES NORDESTINOS. "PLECOSTOMUS PLECOSTOMUS" — Com 17 figuras no texto e estampa 24.
The "Cascudo" or loricate fish of the northeastern reservoirs . . 211-224

21. **O. Bier** — SOBRE O FENONEMO DA "PROMUNIDADE" E SUA SIGNIFICAÇÃO. I - INESPECIFICIDADE E NATUREZA LOCAL DO FENOMENO.
Über das Prommunitäts-Phänomen und seine Bedeutung. I. Mitt. - Unspezifität und lokale Natur des Phänomens 225-232

22. **V. Carneiro** — SOBRE A AUSENCIA DO VIRUS DA DOENÇA DE AUJESZKY NO CEREBRO DOS ANIMAIS.
Absence of the virus of Aujeszky's disease in the brain of animals. 233-252

23. **D. M. Cardoso, P. Nobrega e J. Reis** — AÇÃO DA SULFANILAMIDA SOBRE A INFECÇÃO POR "PASTEURELLA AVICIDA" EM AVES.
Action of Sulfanilamide on the infection caused by "Pasteurella Avicida". 253-260

24. **K. Silberschmidt e J. C. Carvalho** — OBSERVAÇÕES CITOLOGICAS SOBRE O MOSAICO DO FUMO — Com 5 figuras no texto.
Zytologische Beobachtungen über die Mosaik-Krankheit des Tabaks. 261-271

25. **E. Marcus** — BRYOZOARIOS PERFURADORES DE CONCHAS — Com 7 figuras no texto.
Shell burrowing Polyzoa 273-296

26. **V. L. Yakimoff e S. N. Matchulski** — "EIMERIA MACIELI n. sp." PARASITO DO ANTILOPE AQUATICO (COBUS ELLIPSIPRYMNUS OGILBY) — Estampa 25.
"Eimeria Macieli n. sp." a parasite of the water antilope (Cobus ellipsiprymnus OGILBY) 297-298

27. **A. A. Bitancourt** — "PYRENOCHAETA SACCHARI n. sp." E UMA MANCHA DA FOLHA DA CANA DE AÇUCAR — Estampas 26-27.
"Pyrenochaeta sacchari n. sp." and a new leaf spot of the sucar cane. 299-302

28. **P. Bueno** — SOBRE A HISTOPATOLOGIA DA BRONCOPNEUMONIA CONTAGIOSA DOS SUINOS — Estampas 28-35.
On the histo-patology of contagious bronco-pneumonia in swine. 303-312

29. **Adolph Hempel** — UMA NOVA ESPECIE DE "ALEYRODIDAE" (HOMOPTERA) — Estampas 36-38.
A new species of "Aleyrodidae" (Homoptera) 313-314

(CONTINÚA)

Pags.

30. **J. Moreira** — SOBRE A NATUREZA DO NAMBIUVÚ DOS CÃES — Estampa 39.
On the nature of the disease "Nambiuvú" of Dogs. 315-318

31. **E. J. Hambleton e H. F. G. Sauer** — OBSERVAÇÕES SOBRE AS PRÁGAS DA CULTURA ALGODOEIRA NO NORDESTE E NORTE DO BRASIL.
Observations on cotton pests of northern and northeastern Brazil. 319-330

———o———

Vol. 9 — Art. 1 Julho de 1938

CONTRIBUIÇÃO PARA O CONHECIMENTO DO MOSAICO DO FUMO E DOS SEUS HOSPEDEIROS SELVAGENS NO BRASIL

POR

K. Silberschmidt e M. Kramer

Do Instituto Biologico de S. Paulo

Com as estampas 1-4

INTRODUÇÃO

O presente trabalho é o resultado de uma série de pesquisas feitas para o estudo das doenças de virus do fumo no Brasil. Essas pesquisas visavam dois fins:

Primeiro, averiguar se todas as plantas de fumo encontradas atacadas por um «mosaico», em diferentes partes do país e em varias épocas de seu periodo vegetativo, encerravam o mesmo tipo de virus.

Segundo, verificar quais as espécies de Solanaceas, existentes entre as hervas más das culturas, ou que vivem como plantas espontaneas nos campos e matos vizinhos das plantações, que podem funcionar como fócos de infecção, quer apresentando sintomas, quer como plantas aparentemente sãs, mas portadoras *(carriers)* de virus.

PRIMEIRA PARTE

ESTUDOS COMPARATIVOS SOBRE DIVERSAS ORIGENS DO MOSAICO DO FUMO

I) GENERALIDADES — A doença mosaico do fumo é causada por um unico virus, do qual já foram, porém, isoladas diferentes amostras *(strains)*.

Tais «*strains*» concordam entre si nas qualidades principais, mas provocam, nas plantas susceptiveis, sintomas que permitem uma distinção; além disso, diferem tambem um pouco na sua resistencia a condições externas *in vitro*. Esses estudos experimentais foram realizados nos Estados Unidos por MAC KINNEY 1926 (13) e 1929 (14), J. JENSEN 1933 (7), E. JOHNSON 1930 (8) e KUNKEL 1934 (12) e em Java por THUNG 1931 (22) e 1936 (23) e deram a conhecer até as fórmas do virus do mosaico que prevalecem nos respectivos países. Mas no Brasil ainda não se realizara a identificação do respectivo mosaico do fumo.

E' bem verdade que doenças de virus ocorrem frequentemente nas plantações de fumo, no Brasil. A. SACCÁ 1922 (17) e A. PUTTE-

MANS 1936 (16) relatam ter encontrado o mosaico do fumo em 1920 e 1921. A. S. MÜLLER 1934 (15), menciona o mosaico e o *ringspot*.

Essas constatações, porém, referem-se apenas a observações sintomatologicas. Por meio destas pode-se, é verdade, distinguir em geral as doenças causadas por fungos e bacterias, das causadas por virus. Mas a identificação do tipo de virus que causa a doença não é possivel, geralmente, sem o auxilio de pesquisas por inoculação, feitas no laboratorio.

Tais inoculações experimentais foram feitas por SILBERSCHMIDT 1936 (20), que usou como fóco de infecção uma planta de fumo atacada pelo virus e encontrada em um jardim abandonado da capital de S. Paulo. Estudando a resistencia do virus a temperaturas elevadas, *in vitro*, verificou que se tratava, nesse caso, do verdadeiro mosaico do fumo (designado como virus n.º 1 por J. JOHNSON).

Uma descrição dos sintomas principais das doenças de virus das Solanaceas foi dada por KRAMER 1937 (11).

II) MATERIAL — Após termos encontrado o mosaico do fumo em São Paulo, foi nossa intenção averiguar a sua distribuição no Estado e comparar as formas da doença encontradas em diferentes lugares.

Tivemos, em viagens de serviço, ocasião de percorrer diferentes zonas dos Estados de São Paulo e Paraná, produtoras de fumo, e então encontrámos plantas atacadas por uma doença que, pelos sintomas, lembrava o mosaico do fumo.

Isso se deu em Campinas (Fazenda Sta. Elisa, Faz. Mato-Dentro, Faz. Angelica), Itapecerica (Sitio Jesuino Maciel), Limeira (Estação Experimental do Instituto Agronomico), Jataí (Faz. Tres Barras), Rolandia (E. do Paraná, Sitio Marckwald) e Tietê (Estação Experimental do Instituto Agronomico (1) e Campo de Demonstração do Fomento Agricola (2)).

Afim de identificar a natureza exata da doença, cujos sintomas não eram perfeitamente analogos em todas as plantas observadas, tornava-se indispensavel fazer inoculações experimentais no laboratorio. Para não extender demasiadamente o trabalho, limitamo-nos, nesses estudos, a alguns tipos ou formas de doenças. Seis dellas foram colhidas em Tietê, em 3/6/37, por ocasião de uma inspecção efetuada ao C. d. F. A. Damos a seguir a relação desses tipos:

1.º) mosaico grosseiro, no fumo da var. Talo branco (do C. d. F. A.), em que as folhas apresentavam manchas verde-escuras grosseiras e bem acentuadas.

(1) Designado adiante pelas letras E. E. I. A.
(2) Designado adiante pelas letras C. d. F. A.

2.º) fórma «couve», no fumo da var. Talo branco (do C. d. F. A.), caracterisada pelo fato de não alcançar o limbo da folha o ponto de inserção do peciolo na haste, e das margens do limbo se apresentarem crenadas.

3.º) mosaico *veinbanding*, no fumo da var. Amarelinho (da E. E. I. A.), evidenciado por um mosaico muito pronunciado que, sob a fórma de linhas escuras, acompanha exclusivamente o sentido das nervuras secundarias e terciarias.

4.º) mosaico muito fraco no fumo da var. Virginia (E. E. I. A.), caracterisado por apresentarem as folhas manchas verdes mais claras, visiveis somente por transparencia á luz.

5.º) mosaico fraco, no fumo da var. Talo branco (C. d. F. A.), denotado nas folhas por manchas e pequenas linhas de um verde um pouco mais escuro, sem *blistering*.

6.º) fórma papilosa, no fumo da var. Amarelinho (E. E. I. A.), que apresentava nas folhas grande numero de elevações, como papilas, dispostas em cordões entre as nervuras secundarias.

III) RESULTADOS EXPERIMENTAIS — As experiencias foram iniciadas em 4/6/37. Com 1,5 grs. de folhas de cada uma dessas fórmas foram preparados sucos a 1 : 1, os quais foram inoculados em 12 plantas de *Nicotiana sylvestris* SPEG. & CA. e 12 plantas de uma especie de Juá bravo (*Solanum reflexum* SCHRANK?).

Damos a seguir os resultados obtidos nas inoculações:

Primeiro — Todas as inoculações nas plantas de *Nicotiana sylvestris* foram positivas. Pelos sintomas resultantes, porém, resolvemos incluir as fórmas estudadas em 2 grupos: *a* e *b:*

a) As fórmas chamadas mosaico grosseiro, «couve» e mosaico *veinbanding* provocaram, tres semanas após a inoculação, nas folhas novas das plantas de *Nicotiana sylvestris,* sintomas de um mosaico bem acentuado. Esse mosaico era constituido de linhas verde-escuras ao longo das nervuras que, ás vezes, faziam saliencia na superficie da folha; ao mesmo tempo revelava-se uma deformação do limbo que, no caso da fórma mosaico *veinbanding,* se ligava a uma necrose irregular do limbo da folha. Podemos considerar esse tipo da reação como o quadro normal, caracteristico do mosaico do fumo.

b) Diferem desse tipo de reação os sintomas provocados em *Nicotiana sylvestris* pela inoculação das fórmas mosaico muito fraco, mosaico fraco e fórma papilosa. A fórma papilosa começou a manifestar sua atividade por uma clorose e em seguida

transformou-se, exteriorisando sintomas de um mosaico fraco sob a forma de *ring-spot*. O suco do mosaico fraco provocou a formação de um mosaico, porém muito mais tarde, e a fórma mosaico muito fraco, no mesmo praso, não provocou a formação de um mosaico, mas originou um esclarecimento das nervuras das folhas novas e uma clorose sistemica, sem deformação das folhas. Neste ultimo caso resultou ainda um enfezamento da planta inoculada. (Estampa 1, fig. A).

Segundo — As plantas de uma especie de Juá bravo *(Solanum reflexum?)*, inoculadas com as fórmas papilosa e mosaico muito fraco, não mostraram nenhum sintoma. As plantas da mesma especie inoculadas com as outras quatro fórmas do virus adoeceram, sendo os sintomas resultantes mais ou menos identicos entre si. Apenas se constatou certa diferença para o mosaico *veinbanding*, que provocou um mosaico amarelo nas folhas novas daquela Solanacea. (Estampa 1, fig. B).

Assim, pode-se concluir, preliminarmente, que todas as seis fórmas estudadas pertenciam ao grupo do mosaico normal do fumo; mas as reações diferentes das plantas de *Nicotiana sylvestris* aos virus referidos favorecem a idéa de que se trata aqui, pelo menos, de duas fórmas distintas.

Porque esta experiencia não permitia a decisão da questão, de tratar-se de varias especies de virus ou de fórmas diferentes de um só virus, fizemos então pesquisas mais amplas com as seis referidas fórmas. Ao mesmo tempo, incluimos nos nossos estudos a fórma purificada do mosaico normal do fumo, identificada anteriormente por SILBERSCHMIDT (obtida a partir de plantas de fumo encontradas infectadas naturalmente pela doença, dentro da propria capital de S. Paulo) e uma fórma que denominaremos mosaico de Campinas, a qual resultou de inoculações artificiaes feitas com sucos de plantas de fumo, provenientes do I. Agronomico de Campinas, e que tinham apresentado sintomas da doença conhecida vulgarmente por «Vira-cabeça».

Para estas experiencias servimo-nos, como plantas indicadoras, da variedade Scotia de *Phaseolus vulgaris* L. que obtivemos por intermedio do Dr. W. C. PRICE e que reagem ao mosaico do fumo pela manifestação de aneis necroticos.

Assim, a primeira inoculação de *Phaseolus vulgaris* realizou-se em 2/9/37, com os sucos das oito fórmas de virus, preparadas desta vez, em sua maioria, de plantas de *Nic. sylvestris* que haviam sido infectadas com os sucos originaes das doenças. Nesta ocasião, as fórmas estudadas eram caracterisadas em *Nic. sylvestris:*

1) mosaico grosseiro = *blistering*.
2) fórma «couve» = *veinbanding*.
3) mosaico *veinbanding* = *veinbanding*.
4) mosaico muito fraco = enrugamento das folhas.
5) mosaico fraco = *veinbanding* e *blistering*.
6) fórma papilosa = folhas sem alteração na coloração, apenas com pequenas manchas verde-escuras ao longo das nervuras.
7) mosaico S. Paulo puro = semelhante, no momento, á forma papilosa.
8) mosaico Campinas = *blistering* delicado e aneis verdes pouco distinctos e esparsos pelo limbo.

Desse material foram preparados sucos da maneira usual, e inoculados, na proporção de 0,03 cc. por folha, nas duas folhas primarias de cada pé de feijão e em tantos pés quantos existentes em cada vaso.

TABELA I

Efeito dos sucos normais de diversas fórmas de mosaico inoculados em folhas de feijão. Planta experimentada: *Phaseolus vulgaris* var. Scotia

Numero de plantas	Fórma de doença	N.o de dias após a inoculação	Media de lesões necroticas por folha.
6	mosaico fraco.	7	4,66
6	fórma «couve»	7	0,287
6	mosaico grosseiro	7	4,70
6	mosaico muito fraco . . .	7	0,2
6	fórma papilosa	7	3,79
10	mosaico *veinbanding* . . .	7	1,887
10	mosaico S. Paulo	7	1,55
6	mosaico Campinas	7	0,165

Como resultado geral dessa experiencia, podemos concluir que todas as fórmas examinadas continham virus capaz de produzir lesões necroticas nas folhas de feijão. Observamos, porém, que a ação infecciosa não era identica em todas as fórmas estudadas: o mosaico fraco, o mosaico grosseiro e a fórma papilosa encerravam a maior concentração de virus; o mosaico muito fraco, o mosaico Campinas e a fórma «couve» provocaram o menor numero de lesões necroticas, e o mosaico S. Paulo e o mosaico *veinbanding* apresentavam um téôr médio de virus.

Para verificar, então, se essas diversas fórmas eram manifestações da mesma doença do fumo, ou se existiam particularidades que permitissem a distinção em fórmas verdadeiramente diferentes, subme-

temos os sucos a tratamentos por temperaturas que podiam inativar outras fórmas que não as ligadas ao grupo do mosaico do fumo. Os resultados do tratamento dos sucos pela temperatura de 90 gráos, durante 10 minutos, e de sua respectiva inoculação nos feijões e em outras plantas, acham-se expressos no quadro seguinte:

TABELA II

Experiencia comparativa sobre a resistencia dos sucos de diversas fórmas de mosaico a temperaturas elevadas (90 gráos)

Doenças	Plantas experimentadas	N.º de dias após a inoculação	Resultado da inoculação
mosaico fraco. . .	*Phas. vulgaris* var. Scotia	5	—
	Nicotiana glutinosa.	5	+
	Nic. sylvestris.	5	—
	Nic. tab. var. Geudertheimer . . .	5	—
fórma «couve» . .	*Phas. vulgaris*.	5	—
	Nic. glutinosa.	5	+
	Nic. sylvestris.	24	++
	Geudertheimer	11	++
mosaico grosseiro .	*Phas. vulgaris*.	5	—
	Nic. glutinosa.	5	+
	Nic. sylvestris.	24	—
	Geudertheimer	24	++
mosaico muito fraco	*Phas. vulgaris*.	5	+
	Nic. glutinosa.	5	+
	Nic. sylvestris.	7	++
	Geudertheimer	15	++
fórma papilosa . .	*Phas. vulgaris*.	5	—
	Nic. glutinosa.	5	+
	Nic. sylvestris.	24	—
	Geudertheimer	24	++
mosaico S. Paulo .	*Phas. vulgaris*.	5	—
	Nic. glutinosa.	5	+
	Nic. sylvestris.	24	—
	Geudertheimer	11	++
mosaico Campinas .	*Phas. vulgaris*.	5	—
	Nic. glutinosa.	5	—
	Nic. sylvestris.	5	—
	Geudertheimer	5	—
mosaico *veinbanding*	*Phas. vulgaris*.	5	—
	Nic. glutinosa.	5	+
	Nic. sylvestris.	5	—
	Geudertheimer	5	—

Convenções: (—) = nenhum sintoma; (+) = lesões necroticas; (++) = infecção sistemica.

Podemos notar nesse quadro dois grupos de resultados que merecem ser mencionados:

1.º) Os efeitos das oito referidas amostras de mosaico foram bem desiguais. Por exemplo, a amostra do mosaico muito fraco deu resultados positivos em todas as especies de plantas estudadas. Por outro lado, a amostra do mosaico *veinbanding,* que conforme nossa tabela I pode ser considerado como tendo uma alta concentração de virus, deu resultados positivos exclusivamente sobre *Nic. glutinosa* L. Essa diferença pode-se explicar pela hipotese de que as diferentes amostras de virus não suportaram a temperatura de 90 gráos por 10 minutos com a mesma facilidade. O mosaico *veinbanding,* sob esse tratamento, ficou com sua ação mais diminuida do que o mosaico muito fraco.

Além da variação especifica que essas variedades de virus apresentaram pelo tratamento a temperatura elevada, temos que considerar as diferenças na sensibilidade das especies de plantas estudadas, quanto ao virus. Já GRANT 1934 (6) observara que pequenas quantidades de virus, que não têm mais um efeito sobre plantas de *N. glutinosa,* podem ser ainda descobertas quando inoculadas em plantas de *N. tabacum.* No mesmo ano STANLEY 1934 (21) constatou que, em mistura com Tripsina, o mosaico do fumo, que não produzia mais sintomas em *Phaseolus vulgaris,* causava ainda lesões necroticas em *N. glutinosa.*

Das indicações da literatura, concluimos, então, que as tres especies de plantas referidas, usadas em nossas experiencias, podem ser ordenadas na série seguinte, conforme a sensibilidade delas contra o virus:

N. tabacum > *N. glutinosa* > *Phas. vulgaris.*

A essas indicações da literatura correspondem tambem as nossas observações.

2.º) Apesar dessa desigualdade dos resultados, verifica-se que sete das amostras de virus estudadas foram capazes de infectar pelo menos uma das especies das plantas inoculadas.

Considerando que todas as amostras de virus aplicadas foram aquecidas previamente á temperatura de 90 gráos, durante 10 minutos, e que apenas o mosaico do fumo póde resistir a tal temperatura, podemos concluir que todas essas variedades devem pertencer ao grupo do mosaico do fumo.

Ante a diferença consideravel que essas oito amostras de virus apresentaram, não apenas em relação á sua atividade sobre plantas de diferentes especies, mas tambem no conjunto dos sintomas provocados,

era desejavel esclarecer melhor as propriedades dessas variedades do virus do fumo, encontradas em Tietê. Escolhemos para a experiencia somente o mosaico muito fraco e o mosaico *veinbanding*, porque essas fórmas tinham apresentado as diferenças mais acentuadas. Os sucos dessas duas fórmas preparados da maneira usual, foram separados em duas porções e em seguida submetidos ás temperaturas de 60 e 90 gráos, por 10 minutos.

Nesta experiencia inoculámos 18 plantas de *Nicotiana rustica* L. var. *brasilia* e 6 plantas de tomate, *S. lycopersicum* L. var. Rei Umberto. Citaremos agora resumidamente o protocolo dessa experiencia e alguns dados acerca dos resultados.

TABELA III a) e b)

Estudos comparativos das amostras obtidas das fórmas mosaico muito fraco e mosaico *veinbanding*, de Tietê aquecidas por 10 minutos ás temperaturas indicadas (60 e 90 gráos)

a) planta experimentada: *Nic. rustica* var. *brasilia*

Numero de plantas	Fórma de doença	Temperatura	N.o de dias após a inoculação	Resultados da inoculação
3	mos. muito fraco	90 C.	12	+
2	» » »	60 C.	5	+
1	» » »	60 C.	5	+
3	» » »	Não aquecido	5	+
2	» *veinbanding*	90 C.	12	—
1	» »	90 C.	12	+
2	» »	60 C.	5	+
1	» »	60 C.	5	+
3	» »	Não aquecido	5	+
	b) planta experimentada: *Sol. lycopersicum* var. Rei Umberto.			
1	mos. muito fraco	90 C.	5	—
1	» » »	60 C.	21	+
1	» » »	Não aquecido	21	+
1	» *veinbanding*	90 C.	21	+
1	» »	60 C.	21	+
1	» »	Não aquecido	21	+

Os resultados desta experiencia confirmam que, nas duas amostras estudadas, se trata de variantes do mosaico de fumo. Os sucos, tanto da fórma *veinbanding* como da fórma mosaico muito fraco, aquecidos por 10 minutos a 90 gráos, foram ainda capazes de provocar a doença, pelo menos em alguns pés.

Assim, quanto á sensibilidade a temperaturas elevadas, em contradição com o que esperavamos diante dos resultados da experiencia antecedente, as duas amostras não diferem consideravelmente. Verifica-se, porém, certa diferença no quadro dos sintomas produzidos pelas duas variedades nos pés de tomate. As plantas de tomate inoculadas com o suco do mosaico *veinbanding,* apresentaram, como sintomas principais, folhas novas com superficie levemente encrespada e as margens do limbo viradas para cima. Esses sintomas diferem dos provocados pelo mosaico ordinario do fumo (virus n.º 1, de J. Johnson) e que, em grande parte, são encontrados nas plantas de tomate que foram inoculadas com o suco do mosaico muito fraco. Estas ultimas apresentaram, entre outras caracteristicas, folhas novas filamentosas, reduzidas quasi ou exclusivamente ao peciolo.

Afim de esclarecer melhor as diferenças observadas na concentração do virus das diversas amostras e na sua resistencia ao tratamento pela temperatura elevada, a experiencia foi repetida. Mas aqui preferimos substituir as plantas de tomate por plantas de *Nicotiana glutinosa,* que reagem ao ataque da doença por sintomas locaes, e expor desta vez os sucos á temperatura de 80 gráos, por 10 minutos. Dessa maneira, os virus das variedades que não se relacionam com o grupo do mosaico do fumo já seriam inativados, ao passo que as amostras deste ultimo grupo não perderiam a sua atividade.

Assim, em 19/10 preparámos sucos de todas as fórmas da doença em estudo, com eceção do mosaico grosseiro e da fórma «couve», porque estas se tornaram semelhantes, quanto aos sintomas, ao proprio mosaico *veinbanding.* Inoculámos esses sucos em 5 plantas de *Nic. glutinosa* e outras tantas de *Nic. rustica* var. *brasilia;* em cada pé de *Nic. glutinosa* foram tratadas 5 folhas, cada folha com um suco diverso. E em *Nic. rustica* foram inoculadas 2 folhas de cada pé, sendo usados sucos diversos para cada metade de folha, comparando assim 4 sucos em cada pé. Damos a seguir a tabela concernente.

TABELA IV

Inoculações dos sucos de diversas fórmas de mosaico que foram aquecidas a 80 gráos C. por 10 minutos.

Doença	Nic. glutinosa			Nic. rustica		
	Num. de folhas	Num. dias após a inoculação	Media de lesões necroticas p/ fl.	Num. de folhas	Num. dias após a inoculação	Media de lesões necroticas por 1/2 fl.
mos. muito fraco . .	3	3	3	6	8	3,1
fórma papilosa . . .	3	3	16	2	8	15
mos. Campinas. . .	3	3	17,6	2	8	28,5
mos. *veinbanding* . .	3	3	29	2	8	24
mos. S. Paulo . . .	3	3	40,6	4	8	23,7
mos. fraco	3	3	53	4	8	28,7
testemunhas	5	3	—	4	8	—

Os resultados desta experiencia confirmam as principais conclusões das tabelas anteriores, mostrando que todas as amostras de virus estudadas suportam temperaturas elevadas. Todavia, observam-se diferenças de atividade entre as amostras indicando que a do mosaico muito fraco contem a menor, e a do mosaico fraco a maior concentração de virus, entre as varias amostras estudadas por nós. Esse resultado está de acordo com a interpretação da tabela I. Por outro lado, o agrupamento das outras amostras já não corresponde ao da tabela I referida, levando-se aqui em consideração que outras especies de plantas serviram para os estudos, na ocasião da primeira experiencia.

Em ultima analise, podemos concluir que todas as oito fórmas da doença com que trabalhámos, se ligam ao grupo do mosaico normal do fumo, mas que entre elas existem pelo menos tres amostras *(strains)* diferentes, que se distinguem entre si pela concentração em virus e pela resistencia ao aquecimento.

Pretendemos, por isso, continuar as pesquisas sobre as relações existentes entre essas fórmas.

SEGUNDA PARTE

SUSCETIBILIDADE DE DIVERSAS SOLANACEAS NATIVAS DO BRASIL AO MOSAICO DO FUMO

I — GENERALIDADES — O grande numero de especies de Solanaceas selvagens existentes no Brasil, e a sua disseminação de per-

meio com as plantas economicas, chamou desde logo nossa atenção para o importante papel que taes plantas podem exercer em relação ás doenças de virus.

E' conhecido o fato de que a erradicação de taes hervas más que encerram o virus e brotam na visinhança das culturas, tem um papel importante entre os meios de combate das doenças de virus. Assim os trabalhos de GARDNER e KENDRICK 1923 (3) provaram que, nos Estados Unidos, as duas Solanaceas perenes, *Physalis subglabrata* e *Solanum carolinense,* podem encerrar o virus do mosaico do fumo e constituem, por isso, grande perigo para as culturas de fumo ou de tomate. Os citados autores conseguiram, pela erradicação dessas hervas, diminuir consideravelmente a porcentagem de plantas doentes nas culturas.

Mas, para as condições brasileiras, não existem estudos sobre o comportamento das multiplas especies de Solanaceas selvagens, perante o mosaico normal do fumo.

E' bem verdade que algumas das especies de Solanaceas encontradas com frequencia nos nossos campos têm, como hervas más, uma distribuição bastante grande tambem em outros paizes e que essas especies já foram incluidas em estudos de inoculação realizadas por outros autores. Reproduzimos aqui as indicações da literatura sobre a suscetibilidade dessas especies de Solanaceas ao mosaico do fumo, especies que tambem fizeram parte dos nossos estudos:

Ao *Solanum nigrum,* já ALLARD 1914 (1) conseguira transmitir com facilidade o mosaico do fumo. Mais tarde, J. JOHNSON 1926 (9) inclue o *S. nigrum* entre as especies de que se servira para diferenciar varios tipos de virus. SCHAFFNIT e MÜLLER 1931 (19) referem que o *S. nigrum,* atacado pelo mosaico, mostra nas folhas manchas de côr verde-clara, de tamanho diferente e distribuição irregular entre as áreas escuras. Muitas vezes tambem pode ser encontrado um *blistering.*

Quanto ás outras especies de Solanaceas, grande numero delas (30) foi estudado por DICKSON 1922 (2). Visto que DICKSON não trabalhou com uma fórma purificada do mosaico, esses estudos têm hoje principalmente um interesse historico.

B. GOLDSTEIN 1924 (4) e 1926 (5) relatou que nas celulas de plantas de *S. aculeatissimum,* infetadas pelo mosaico de fumo, as inclusões tipicas, isto é, os corpos X e corpos estriados *(X-bodies* e *striated-bodies)* podem ser observados com grande facilidade. J. JOHNSON e J. GRANT 1932 (10) citaram 15 especies de Solanaceas hospedeiras para o mosaico de fumo, entre as quais mencionam tambem o *S. atropurpureum.*

E' bem provavel que essa lista da literatura não seja ainda completa. Mas da consideração desses trabalhos resulta a falta de uma descrição completa do quadro sintomatologico da doença nas especies cuja ocorrencia é mais frequente nos campos e nas roças do E. de São Paulo. Quisémos então investigar o assunto, que tem grande importancia do ponto de vista pratico e, por isso, fizémos inoculações com o mosaico do fumo, em caixas á prova de insetos, em um certo numero de Solanaceas. Estas abrangiam as especies comumente encontradas na visinhança das culturas.

II) MATERIAL — Para conseguir um material mais uniforme que servisse para as infecções, inoculámos primeiro uma planta de *Nic. glutinosa* com a fórma de mosaico de fumo que encontramos em São Paulo; em seguida cortámos, com uma tesoura esteril, um anel necrotico de uma folha de *Nic. glutinosa* e preparámos assim um suco com o qual inoculámos uma planta de *Nic. sylvestris*.

Após algumas semanas essa planta mostrou estar atacada pelo mosaico de fumo. Sucos prensados dessa planta serviram então para inocular plantas de diferentes especies e variedades de Solanaceas.

Uma parte das sementes dessas diversas especies foi pessoalmente colhida por nós em varias zonas do Estado. Pela remessa da outra parte das sementes devemos agradecimentos aos Drs. A. SANTOS COSTA, assistente do Instituto Agronomico de Campinas, P. CAMPOS PORTO, diretor do Instituto de Biologia Vegetal do Rio de Janeiro, e TH. STOMPS, diretor do Jardim Botanico da Univ. de Amsterdam.

Na classificação sistematica das especies prestaram-nos seu precioso auxilio os srs. J. F. TOLEDO, S. DECKER e F. C. HOEHNE. Mesmo assim não foi possivel determinar exatamente todas as especies estudadas, dada a grande semelhança muitas vezes existente entre as numerosissimas Solanaceas nativas brasileiras.

Por isso, quando não tivermos certeza da denominação cientifica da planta, daremos apenas o nome pelo qual reconhecemos as sementes conservadas em nossa coleção, e a sua procedencia, reservando para o futuro a possibilidade de uma classificação exata.

Fóra disso, acrescentámos, para algumas especies, os nomes vulgares usados em São Paulo.

As inoculações foram feitas em tres dias diferentes, isto é, 19/8, 4/9 e 2/10. Usamos sempre suco na diluição 1:1. Reunimos na tabela V, as indicações das especies e variedades usadas.

TABELA V

Proveniencia e determinação de uma serie de hospedeiros para o mosaico do fumo

N.º	Proveniencia	Fornecedores	Nome vulgar	Nome cientifico
1	Cascata (sitio P. Azevedo)	S. Costa	Juá bravo?	*S. reflexum?*
2	Cascata	Silberschmidt	Juá bravo? sementes pequenas	*S. reflexum?*
3	Jardim Botanico do Rio de Janeiro	P. Campos Porto	Arrebenta-cavalo ou maçã de Sodoma	*S. aculeatissimum*
4	Campinas. Faz. Monte Deste	S. Costa	Juá vermelho? sem espinho no fruto	*S. aculeatissimum*
5	Desconhecida	S. Costa	Juá manso?	*S. aculeatissimum*
6	Jardim Botanico do Rio de Janeiro	P. Campos Porto	Maminha de porca	*S. mammosum*
7	Pirassununga. Faz. Fernando Costa	Silberschmidt	Arrebenta-boi	*S. atropurpureum*
8	Campos Jordão (Abernessia)	Silberschmidt	Juá bravo?	*S. platanifolium?*
9	Cascata. Faz. S. Pedro	S. Costa	Juá bravo?	*S. platanifolium?*
10	Poços de Caldas	Silberschmidt	Solanacea desconhecida	?
11	Tremembé	Kramer	Japicanga	*S. variabile*
12	Jardim Botanico de Coimbra	Stomps	Juá manso	*S. sisymbrifolium*
13	Pirassununga. Faz. Fernando Costa	Silberschmidt	Juá manso	*S. sisymbrifolium*
14	Piracicaba. Escola Agricola L. Queiroz	Kramer	Giló	*S. giló*
15	Campinas. Fazenda Sta. Elisa	S. Costa	Maria pretinha	*S. nigrum*
16	Jardim Botanico do Rio de Janeiro	Campos Porto	Herva de Sta. Barbara	*S. argenteum*
17	Horto Botanico de Löven	Stomps	Pimenteira falsa dos jardins	*S. pseudocapsicum*
18	S. Paulo	Kramer	Tomate	*S. lycopersicum* var. Rei Umberto

Designamos com ? os nomes vulgares sujeitos ainda á confirmação.

III) RESULTADOS EXPERIMENTAIS — Com eceção das tres especies *Solanum argenteum* DUN., *S. pseudocapsicum* L. e *S. variabile* MART., das quais trataremos ainda no fim do trabalho, todas as outras especies estudadas foram facilmente infetadas pelo mosaico do fumo.

Segue o quadro dos sintomas apresentados por cada uma das especies em apreço:

1) *Solanum reflexum* SCHRANK? — cerca de 15 dias após a inoculação, observamos nas folhas novas desta especie um esclarecimento das nervuras e um enrugamento do limbo (Estampa 2, fig. C).

Mais tarde (± 30 dias após a inoculação) constatámos um mosaico tipico, que se manifesta muitas vezes de tal modo que as partes cloroticas acompanham as nervuras secundarias (estampa 1, fig. B, b). Divide-se assim o limbo da folha numa rêde de fios claros, entre cujas malhas se encontram áreas verdes mais escuras. Nessa ocasião, as folhas novas podem mostrar-se tambem deformadas.

No estado final, os sintomas se limitam a um mosqueado (= *mottling)* em quasi todas as folhas, cuja superficie permanece porem lisa. Ás vezes, ainda, as partes cloroticas das folhas novas apresentam uma coloração amarela. Sintomas analogos aos descritos acima verificámos tambem, abundantemente, em Novembro de 1937, em plantas espontaneas nos arredores de Prata.

2) *Solanum aculeatissimum* JACQ. — esta especie manifesta tambem a doença, cerca de duas semanas após a inoculação, por meio de um enrugamento do limbo e um esclarecimento das nervuras.

Uma semana mais tarde, surge uma clorose acentuada ao lado das nervuras esclarecidas. Como particularidade desta especie observamos, então, que as proprias nervuras podem tornar-se necroticas, provocando assim uma deformação das folhas (estampa 2, fig. E). Finalmente, quatro semanas após a inoculação, observámos apenas um mosqueado tipico do mosaico nas folhas novas e médias (Estampa 2, fig. F).

3) *S. mammosum* L. — Nesta especie os sintomas são semelhantes aos de *S. aculeatissimum,* e a época da incubação (15 dias) tambem é correspondente. Notamos nesta especie o enrugamento das folhas novas, clorose parcial e mesmo necroses das nervuras, como as descritas para o caso de *S. aculeatissimum.* Em certos casos distinguiu-se um mosaico irregular, na forma de um *veinbanding* fraco.

4) *S. atropurpureum* SCHRANK — nas plantas dessa especie o virus do mosaico do fumo produziu reações bem acentuadas: 20 dias depois da inoculação notámos nas folhas novas uma clorose e um esclarecimento das nervuras, ao passo que

as folhas médias tinham algumas necroses. Dez dias mais tarde, os sintomas já eram tipicos, especialmente em relação á forma das folhas: enquanto a folha sadia é duplamente lobada, tendo os lóbos pouco distanciados entre si, a folha doente mostra-se alongada e é quasi desprovida dos lóbos secundarios (estampa 2, fig. G). Assim, na folha doente a maior parte do limbo acompanha a nervura principal, ao passo que na folha sadia a maior parte do limbo pertence aos lóbos. As folhas médias mostram um mosaico em fórma de *veinbanding* e as áreas verdes mais escuras sobresaem na superficie. Mesmo 4 mezes após a inoculação os sintomas da doença são ainda bem visiveis, mantendo-se as partes cloroticas perfeitamente distintas da parte verde-escura, e apresentando menor espessura.

5) *S. platanifolium* HOOK.? — Nesta especie, cerca de um mez após a inoculação surge um mosaico nas folhas médias. As folhas novas são enroladas para baixo e apresentam, ás vezes, fortes necroses das nervuras, o que provoca uma descoloração do limbo e um impedimento no desenvolvimento da folha (estampa 3, fig. H). Com o tempo esses sintomas enfraquecem, mas subsiste a inhibição do crescimento da planta e distingue-se apenas um mosqueado nas folhas (estampa 3, fig. I).

6) Solanacea desconhecida, de Poços de Caldas — Depois de 3 semanas do tratamento, necroses das nervuras das folhas mais novas. Essas necroses podem ser observadas ainda um mez mais tarde, sem que as folhas apresentem os sintomas tipicos do mosaico.

7) *S. sisymbrifolium* LAM. — os primeiros sintomas da doença apresentam-se 3 semanas após a inoculação, sob o aspecto de um mosqueado delicado e uma clorose nas folhas médias; na semana seguinte as folhas novas tornam-se filamentosas e suas margens encrespam-se. Esses sintomas fortes permanecem pouco tempo e 3 semanas mais tarde o quadro sintomatologico limita-se ao mosqueado, sem *blistering* (estampa 3, fig. J).

Numa plantação de batatinha, em Cascata, em condições naturaes, já encontramos plantas de *S. sisymbrifolium* com manchas nas folhas, que lembravam o quadro sintomatologico causado pelo mosaico.

8) *S. giló* RADDI. — de todas as que estudamos, é a unica especie que reagiu por sintomas locaes, ao virus do mosaico.

Na folha inoculada apareceram, duas semanas depois do tratamento, lesões necroticas cercadas por um anel clorotico (estampa 4, fig. K). O numero dessas lesões foi em geral elevado (86-91) para um suco diluido a 1 : 1. Os sintomas geraes são pouco distinctos. Ás vezes observámos nas folhas novas séries de papilas em cordão entre as nervuras secundarias, mas nunca os sintomas geraes de mosaico.

9) *S. nigrum* L. — os sintomas observados nessas plantas correspondem aos da literatura (SCHAFFNIT e MÜLLER, 1931, 19). Tres semanas depois do tratamento notámos nas folhas novas um mosaico com *blistering,* que se transformou mais tarde em um mosqueado fraco.

10) As plantas de *S. argenteum* DUN. e as de *S. pseudocapsicum* L. não deram sintomas.

11) *S. variabile* MART. — em relação ao mosaico do fumo o comportamento dessa planta é de grande importancia. Sendo o *S. variabile* uma das hervas mais frequentes dos nossos campos, taes plantas, quando infetadas, podem representar um enorme perigo para as plantas cultivadas. Naturalmente esse perigo será ainda maior se por acaso as plantas abrigarem o virus sem o mostrar *(carrier).* As nossas experiencias preliminares falam justamente em favor dessa possibilidade de ser a planta um «portador» *(carrier)* de virus do mosaico do fumo. Fizémos inoculações em plantas de *S. variabile* por meio de fricção e tambem de enxertia. De maneira nenhuma conseguimos até agora provocar, nas folhas, sintomas que lembrassem sequer vagamente os que o mosaico provoca, quer no Juá bravo, quer nas plantas de fumo. Os unicos sintomas que observámos, numa parte das plantas, consistem em uma clorose do limbo entre as nervuras secundarias, a qual difere do tipo da clorose de *S. atropurpureum* pelo fato de não serem as zonas cloroticas bem distintas das zonas escuras (estampa 4, fig. L).

Afim de provar se as plantas inoculadas encerram o virus sem mostrar sintomas caracteristicos, preparámos sucos das plantas suspeitas e com eles friccionámos folhas de feijão *(Phas. vulgaris* var. Scotia), de *Nic. glutinosa,* de *Nic. sylvestris* e de *Nic. tabacum* var. *White Burley.* De fato, conseguimos com alguns desses sucos provocar os sintomas do mosaico de fumo, pelo menos em uma planta de cada uma dessas especies sensiveis. Pretendemos con-

tinuar essas experiencias, para verificar se as plantas de *S. variabile* encerram, tambem em condições naturais, o virus causador da doença.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Se considerarmos o fim e os resultados de nosso trabalho, podemos deduzir que cada parte apresenta um lado de interesse pratico e outro, de teorico. Assim é que, quanto ás fórmas de mosaico de fumo encontradas nas culturas no E. de S. Paulo, o seu conhecimento é naturalmente indispensavel para o controle eficaz da doença.

Além desse fim pratico, iniciamos essas experiencias, tambem com a intensão de encontrar variedades muito fracas de mosaico, que fossem adequadas á realização de experiencias de imunização, tais como as executadas por SALAMAN 1933 (18) e KUNKEL 1934 (12). Mas as variedades por nós encontradas até o presente são ainda demasiado ativas para servir como préimunisantes *(Schutzimpfung)*.

Tambem o interesse pratico e teorico da questão são encontrados na segunda parte do nosso trabalho. O fim pratico consiste em averiguar quais as especies de Solanaceas indigenas do Brasil que constituem um perigo para a disseminação das doenças de virus. Podemos dizer agora que o *S. atropurpureum,* o *S. aculeatissimum,* o *S. reflexum* e o *S. sisymbrifolium* e talvez tambem *S. variabile* podem hospedar o virus e devem ser erradicados da vizinhança das culturas.

O interesse teorico da segunda parte reside no fato de muitas especies de Solanaceas nativas do Brasil não terem sido ainda estudadas quanto ao seu comportamento contra o mosaico do fumo.

Das inumeras outras especies estudadas pelos outros autores, quasi todas foram suscetiveis a essa doença (vide JOHNSON e JOHNSON & GRANT, 9 e 10). Se acharmos, entre os representantes dessa familia, especies que se mostrem resistentes á doença, isso dará a possibilidade de estudar as causas dessa resistencia, assim como encontrar caminhos que permitam um controle da doença nas especies suscetiveis.

BEITRAG ZUR KENNTNIS DER MOSAIK-KRANKHEIT DES TABAKS UND DEREN IN BRASILIEN WILDWACHSENDEN WIRTSPFLANZEN

Zusammenfassung

I) Von 8 Tabakpflanzen, die verschiedene Ausprägungsstufen einer Viruskrankheit vom Mosaiktypus aufwiesen, wurde im Staate São Paulo Material gesammelt.

Mit Hilfe von Infektionsversuchen sollte geprüft werden, ob die verschiedenen Herkünfte das gleiche Virus bergen und um welche Virusart es sich handelt. Es ergab sich, dass alle geprüften Herkünfte

das echte Mosaikvirus des Tabaks enthielten, dass aber die Presssäfte, die aus diesen Herkünften gewonnen wurden, deutliche Unterschiede im Hinblick auf den Grad des Infektionsvermögens erkennen liessen. Es liessen sich — nach dem Ausfall der Infektionsversuche — die 8 Herkünfte in Bezug auf die Aktivität des in ihnen enthaltenen Mosaikvirus in 3 verschiedene Gruppen einreihen.

II) Die Anfälligkeit einer Reihe wild wachsender Solanaceen, die hier teilweise als häufige Unkräuter in der Nähe von Tabak- und Kartoffelfeldern vorkommen, gegenüber dem Tabakmosaikvirus wurde geprüft. Als leicht infizierbar mittels Saftes erwiesen sich die folgenden Arten: Sol. reflexum SCHRANK?, *S. platanifolium* HOOK?, *S. aculeatissimum* JACQ, *S. mammosum* L., *S. atropurpureum* SCHRANK, *S. sisymbrifolium* LAM. *und S. nigrum* L.

Die bei den einzelnen Arten hervorgerufenen Krankheitssymptome werden beschrieben. S. variabile MART. *scheint als «Träger» des Virus zu wirken, ohne selbst deutliche Symptome zu zeigen.*

In der Diskussion wird die Bedeutung des Ausjätens der wild wachsenden Solanaceen für die Herabsetzung des prozentualen Krankheitsbefalles der Tabakskulturen erörtert.

BIBLIOGRAFIA

1 — ALLARD, H. A. — 1914 — The mosaic disease of tobacco. *U. S. Dept. Agr. Bull.*, **40**, 1-33.

2 — DICKSON, B. T. — 1922 — Studies concerning mosaic diseases. *Tech. Bull. 2 Mac Donald College, Que. Can.*

3 — GARDNER, M. W. and KENDRICK, J. B. — 1923 — Field control of tomato mosaic. *Phytopath.*, **13**. 372-375.

4 — GOLDSTEIN, B. — 1924 — A cytological study of living cells of tobacco plants affected with mosaic disease. *Bull. of Torrey Club*, **51**, 261-273.

5 — GOLDSTEIN, B. — 1926 — A cytological study of the leaves and growing points of healthy and mosaic diseased tobacco plants. *Bull. of Torrey Club*, **53**, 499-599.

6 — GRANT, T. J. — 1934 — The host range and behavior of the ordinary tobacco-mosaic virus. *Phytopath.*, **24**, 311-336.

7 — JENSEN, JAMES H. — 1933 — Isolation of yellow-mosaic viruses from plants infected with tobacco-mosaic. *Phytopath.*, **23**, 964-974.

8 — JOHNSON, E. M. — 1930 — Virus diseases of tobacco in Kentucky. *Ky. Agr. Expt. Sta. Bul.*, 306.

9 — JOHNSON, J. — 1926 — Mosaic disease on different hosts. *Phytopath.*, **16**, 141-149.

10 — JOHNSON, J. and GRANT, T. J. — 1932 — The properties of plant viruses from different host species. *Phytopath.*, **22**, 741-757.

11 — KRAMER, M. — 1937 — As doenças de virus das plantas. *O Biologico*, **3**, 51-54.

12 — KUNKEL, L. O. — 1934 — Studies on acquired immunity with tobacco and aucuba mosaics. *Phytopath.*, **24**, 437-466.

13 — Mac Kinney, H. H. — 1926 — Virus mixtures that may not be detected in young tobacco plants. *Phytopath.*, **16**, 893.

14 — Mac Kinney, H. H. — 1929 — Mosaic diseases in the Canary Islands, West Africa and Gibraltar. *Jour. Agr. Res.*, **39**, 557-578.

15 — Müller, A. S. — 1934 — Lista preliminar de las enfermedades de las plantas cultivadas en el Estado de Minas Geraes. *Monitor Internacional de la Defensa de las Plantas*, **9**, 193-198.

16 — Puttemans, A. — 1936 — Alguns dados para servir á historia da Phytopathologia no Brasil e ás primeiras notificações de doenças de vegetaes neste paiz. Contr. apresentada á Primeira Reunião de Phytopathologistas do Brasil. *Rodriguesia*, **4**, N.º especial, pp. 17-36.

17 — Saccá, R. Averna. — 1922 — Algumas das molestias cryptogamicas do tabaco. *Boll. Agricultura de S. Paulo*, **23**, 201-268.

18 — Salaman, R. N. — 1933 — Protective inoculation against a plant virus. Nature, **131**, N.º 3309, p. 468.

19 — Schaffnit, E. u. Müller, W. — 1931 — Wechselseitige Virusübertragungen innerhalb der Familie der Solanaceen. *Phyt. Zeitsch.*, **3**, 105-136.

20 — Silberschmidt, K. — 1936 — O mosaico do fumo. *O Biologico*, **2**, 381-384.

21 — Stanley, W. M. — 1934 — Chemical studies on the virus of tobacco mosaic. I. Some effects of trypsin. *Phytopath.*, **24**, 1055-1085.

22 — Thung, T. H. — 1931 — Smetstof en plantencel bij enkele virusziekten van de tabaksplant. *Handelingen Nederl. - Ind. Natuurwetenschappelijk. Cong.*, **6**, 450-463.

23 — Thung, T. H. — 1936 — Infective principle and plantcell in some virus diseases of the tobacco plant II. *Handelingen Ned. - Ind. Natuurwetenschappelijk Congres*, **7**, 496-507.

———o———

EXPLICAÇÃO DAS FIGURAS

Estampa 1

Fig. A — Sintomas produzidos em *Nic. sylvestris* pelas fórmas: a) mosaico muito fraco (sintomas tardios), b) mosaico fraco, c) mosaico S. Paulo e d) fórma papilosa. 2/3 tam. nat.

Fig. B — Sintomas produzidos em *Sol. reflexum* (?) pelas fórmas: a) mosaico fraco, b) mosaico grosseiro e c) *veinbanding*. 2/3 tam. nat.

Estampa 2

Fig. C — Folhas de *Sol. reflexum* (?) inoculado com o mosaico do fumo: a) com esclarecimento das nervuras (sintomas precoces), b) com *mottling* (sintomas tardios) e c) folha sadia. 2/3 tam. nat.

Fig. D — Folha nova de uma planta de *Sol. aculeatissimum,* infectada com o mosaico do fumo. Mostra encrespamento do limbo e esclarecimento das nervuras. 2/3 tam. nat.

Fig. E — Folha média de *Sol. aculeatissimum,* da planta referida na fig. D, com forte necrose das nervuras e do limbo. 2/3 tam. nat.

Fig. F — Sintomas tardios do mosaico em uma folha de *Sol. aculeatissimum.* 2/3 tam. nat.

Fig. G — Folhas de *Sol. atropurpureum*: a) de uma planta doente, apresentando deformação, esclarecimento das nervuras e um mosqueado delicado; b) sadia. Tam. nat.

Estampa 3

Fig. H — Planta de *Sol. platanifolium* (?), mostrando forte necrose apical e encurvamento do limbo das folhas novas para baixo. Tam. nat.

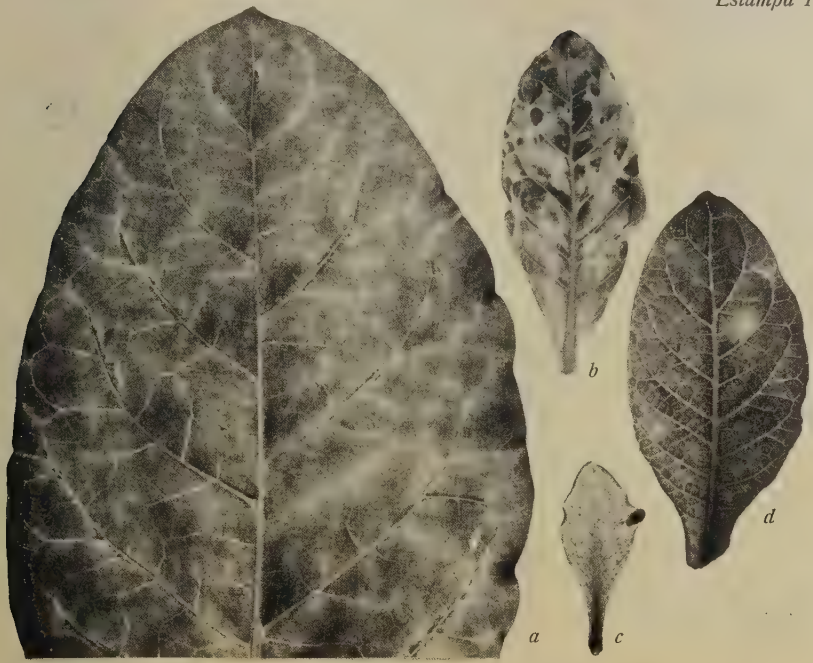
Fig. I — Mosqueado numa folha de *Sol. platanifolium* (?) doente. 2/3 tam. nat.

Fig. J — Duas folhas de *Sol. sisymbrifolium*: a) doente, com um mosqueado delicado e b) sadia. Tam. nat.

Estampa 4

Fig. K — Folhas de *Sol. giló:* a) com sintomas locais, necroticos, produzidos pelo mosaico do fumo na folha inoculada; b) folha sadia. Tam. nat.

Fig. L — Folha sadia (a) e folha doente (b) de *Sol. variabile.* A folha doente apresenta uma clorose parcial do limbo entre as nervuras secundarias. 2/3 tam. nat.



A

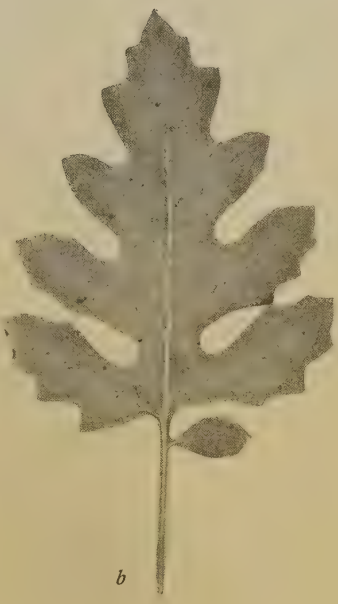
B

C
a
b
c
D
E
F
G
a
b

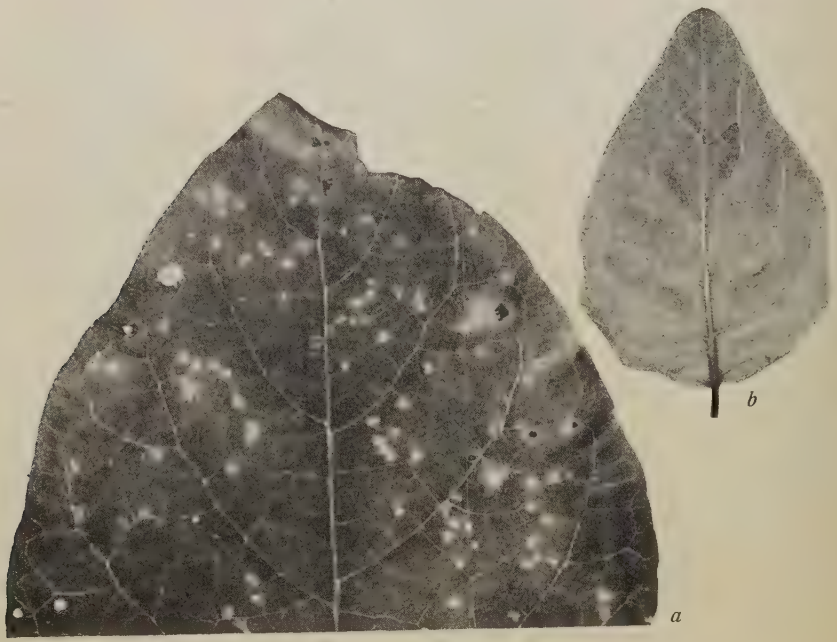
H

I

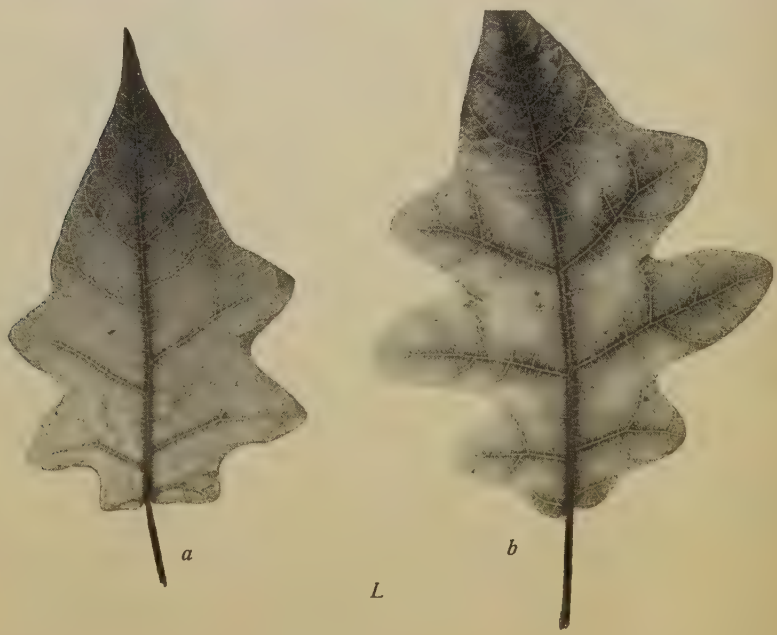
a *J*



b



K



L

Vol. 9 — Art. 2 Julho de 1938

SOBRE AS LESÕES PRODUZIDAS PELA "CAPILLARIA PERFORANS" KOTLÁN E OROSZ NAS AVES DOMESTICAS

POR

J. Reis e P. Nobrega

Do Instituto Biologico de S. Paulo

Com as estampas 5-8

Uma revisão das Capilarias que parasitam o trato digestivo anterior de aves, e das alterações que causam, foi recentemente feita por CRAM. Nesse trabalho se lê que *C. perforans* KOTLÁN e OROSZ, 1931, apenas foi consignada em perú, onde causa alterações na mucosa do esofago e papo. Quanto á distribuição geografica, o helminto em questão apenas havia sido assinalado na Hungria. Entre as capilarias que ocorrem em galinha de Angola FREITAS e ALMEIDA, em sua revisão sobre capilarioses de aves domesticas, apenas referem as especies *C. longicollis* (RUDOLPHI, 1819) e *C. collaris* (LINSTOW, 1873) ambas parasitas do trato posterior do tubo digestivo.

O presente trabalho trata da observação de capilariose no trato digestivo anterior (papo e esofago) de galinhas de Angola comuns *(Numida meleagris dom.)* e da Abissinia *(Numida ptylorhyncha),* assim como de faisões *(Phasianus colchicus torquatus).* Na primeira dessas especies observamos infestações maciças, ocorrendo epizooticamente, e causando perdas sensiveis entre os animais mais novos. Da segunda especie apenas examinamos alguns raros exemplares adultos, de uma criação tambem infestada por *Syngamus trachea,* sem que fosse possivel atribuir á capilariose efeitos identicos aos assinalados na primeira especie.

Os animais infestados apresentam-se tristes e pouco ativos. A mortalidade se revelou alta.

Na necropsia, chama a atenção na maioria dos casos uma dilatação do papo, ás vezes muito acentuada; mais rara é a dilatação do esofago. As lesões observadas ora consistem em pequenas massas circulares, faceis de destacar, ora em um uniforme espessamento da mucosa, que fórma pregas avantajadas e apresenta-se, ás vezes, coberta de numerosas papilas visiveis a olho nú. Em *Numida ptylorhyncha* as lesões mais importantes se encontravam muito anteriormente, ao nivel do soalho bucal, onde havia reação inflamatoria acentuada, com necrose

dos tecidos, interessando tambem a base da lingua; o aspecto lembrava o que comumente se encontra na difteria, em galinhas domesticas; nos tecidos doentes, entretanto, encontravam-se Capilarias em grande quantidade.

Em um dos casos observados em galinha de Angola comum havia concomitantemente infecção do papo por *Trichomonas* sp.; neste caso as Capilarias eram particularmente abundantes no diverticulo, cuja mucosa apresentava o espessamento já referido, e muito mais raras na porção esofagiana do papo, onde se encontravam ulcerações extensas associadas ao *Trichomonas*.

Histologicamente se observa em certos casos uma inflamação cruposa, com necrose do epitelio, interessando ás vezes grandes extensões; corresponde este quadro microscopico ao aspecto macroscopico formado por massas cremosas circulares e pequenas, ou extensas. Mais frequentemente o que se observa é uma simples proliferação do epitelio com corneificação progressiva, e formação de inumeras papilas. O epitelio apresenta-se crivado de orificios de penetração dos vermes; em torno desses orificios ha moderada reação leucoctaria (eosinofilos). Nos casos em que ha necrose acentuada do epitelio com reação cruposa, a infiltração por eosinofilos é mais pronunciada.

As Capilarias ocupam todas as posições no epitelio, mas são encontradas com mais frequencia nas camadas profundas, ás vezes fazendo saliencia no tecido conjuntivo subjacente e na muscular.

Apesar do grande comprimento da especie em questão, (até 15 cms.), é preciso cuidado ao procura-la, pois passará despercebida si não se fizer raspado cuidadoso da mucosa.

A determinação do verme referido nesta nota foi feita pelo Dr. Zeferino Vaz, a quem agradecemos.

ON THE LESIONS CAUSED BY "CAPILLARIA PERFORANS" KOTLÁN AND OROSZ IN DOMESTICATED BIRDS

Abstract

The authors report the occurrence of Capillaria perforans Kotlán *and* Orosz *as a parasite of guinea-fowls (Numida meleagris dom.), Aethiopian guinea-fowls (N. ptylorhyncha) and pheasants (Phasianus colchicus torquatus). Among guinea-fowls the parasite causes heavy infestations and losses. It dwells in the crop and oesophagus, producing extensive lesions which are described in the paper. The authors are indebted to Dr.* Zeferino Vaz *for the identification of the parasite.*

BIBLIOGRAFIA

CRAM, E. B. — 1936 — Species of Capillaria parasitic in the upper digestive tract of birds. *United States Dept. Agric., Techn. Bul.* **516**, 28 pags.

FREITAS, J. F. T. e ALMEIDA, J. L. — 1935 — O genero Capillaria Zeder, 1800 e as Capilarioses nas aves domesticas. *Rev. Dept. Nac. Prod. Animal,* n.os **4, 5, 6**: 311-363.

EXPLICAÇÃO DAS FIGURAS

Estampa 5

Fig. A — Papo e esofago de galinha de Angola; mucosa recoberta de massas caseosas (r. cruposa) não aderentes.

Fig. B — Papo muito dilatado, com a mucosa hipertrofiada, no esofago, ulcerações associadas a *Trichomonas sp.*

Estampa 6

Fig. C — Papo e esofago mostrando proliferação papilar da mucosa, e numerosas Capilarias.

Fig. D — Papo com espessamento acentuado da mucosa.

Fig. E — Papo de galinha de Angola: vêm-se numerosas Capilarias (aumentado).

Fig. F — Papo com Capilarias (aumentado): vê-se uma alça formada pela parte média de uma Capilaria cujos extremos se acham enfiados no epitelio.

Estampa 7

Fig. G — Corte de papo mostrando as Capilarias alojadas no epitelio.

Fig. H — Corte do papo mostrando necrose e hiperkeratinização.

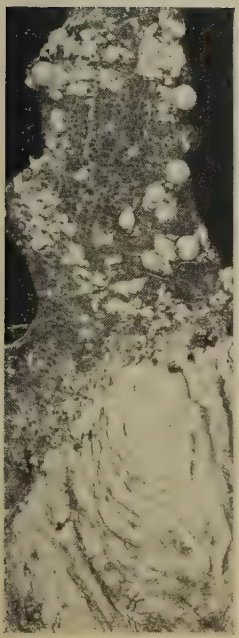
Estampa 8

Fig. I — Corte de papo mostrando necrose do epitelio e infecção da mucosa.

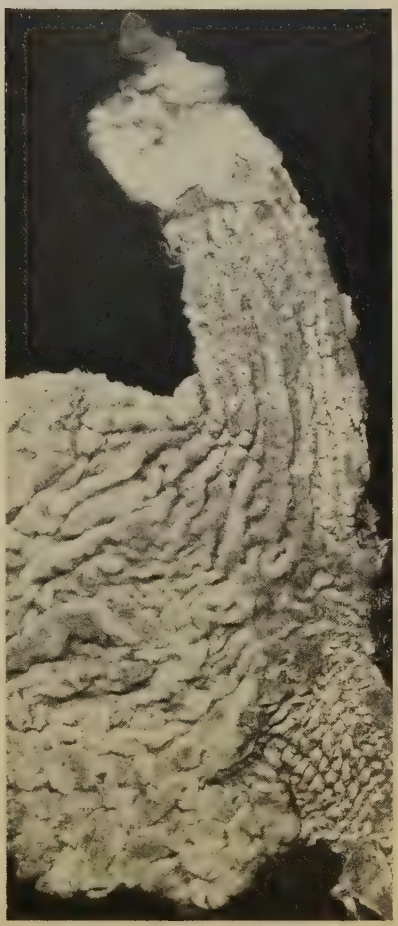
Fig. J — Corte do epitelio do papo mostrando o processo de hiperceratose com formação de papilas.

Fig. K — Corte do epitelio do papo mostrando a implantação de um exemplar de *C. perforans.*

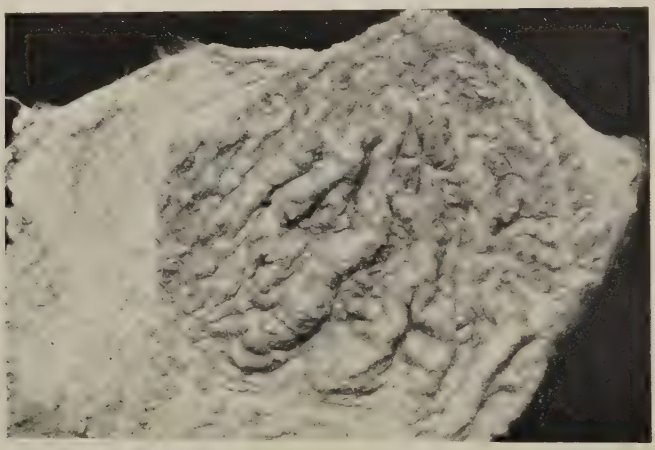
Todas as fotografias de A. Federman.



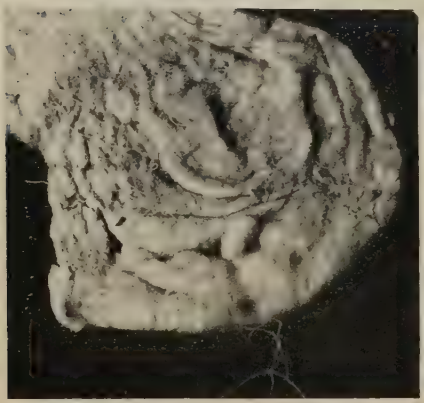
A



B



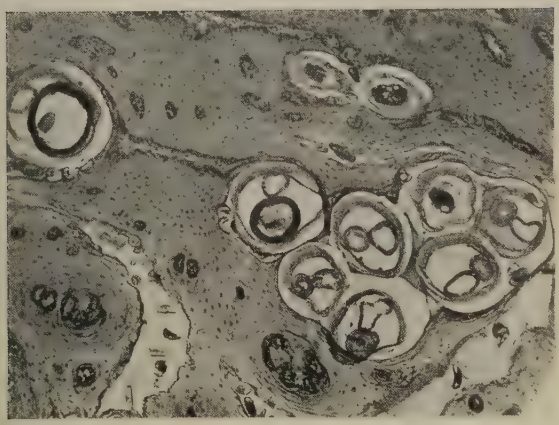
D



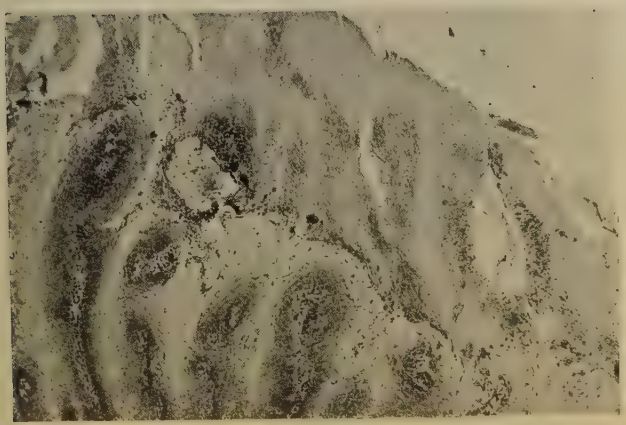
C

F

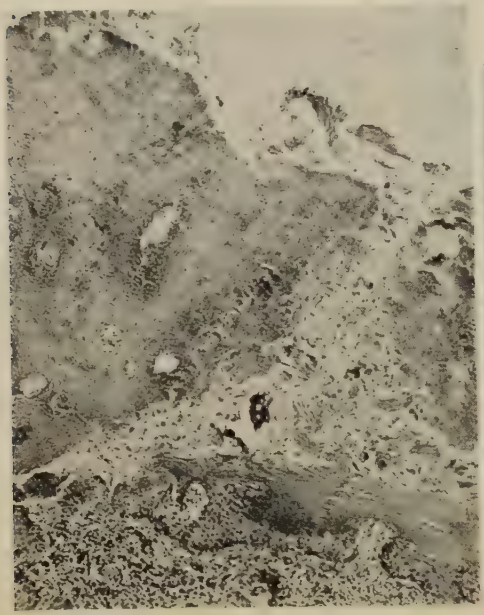
E



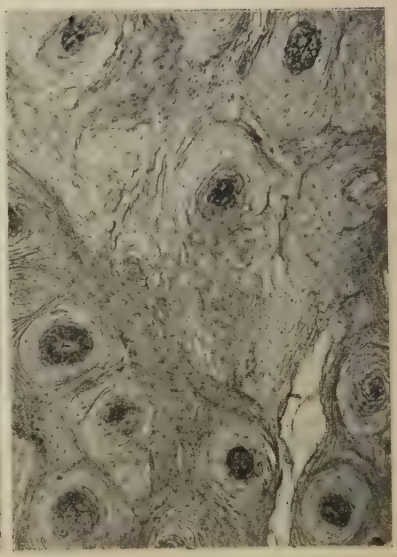
G



H



I



J

K

Vol. 9 — Art. 3 Agosto de 1938

SOBRE A OXIDAÇÃO DO ACIDO LACTICO NO ENCEFALO DE ANIMAIS NORMAIS E EM AVITAMINOSE B_1

LOCALISAÇÃO DA LESÃO QUIMICA NOS MAMIFEROS E NAS AVES

POR

P. E. Galvão e J. Pereira

Do Instituto Biologico de S. Paulo

Para explicar o mecanismo de ação da vitamina B_1 uma das teorias que mais sucesso tiveram foi a que lhe atribuiu um papel de primeira ordem nas oxidações organicas gerais.

Defendida, principalmente, pelos grandes nomes de E. ABDERHALDEN e W. R. HESS, não escapou, porém, ás criticas de outros investigadores, que responsabilisaram o estado de inanição parcial, verificado durante o periodo de alimentação privada de vitamina B_1, pela baixa de metabolismo.

Essa questão foi por nós considerada ha alguns anos (4 e 5), em colaboração com CARDOSO.

As nossas experiencias não consistiram somente em mostrar que a baixa do metabolismo tambem se verifica na inanição total ou parcial, mas sobretudo em demonstrar que, pela alimentação forçada com o arroz polido, se pode obter um beriberi tipico, sem baixa de oxidações.

Pensavamos com isso ter posto fora de causa a ideia de que a vitamina B_1 tivesse importancia nas combustões gerais do organismo. Tal não foi porém a opinião de E. ABDERHALDEN.

Em resposta ao nosso trabalho, publicou esse notavel investigador, em colaboração com WERTHEIMER (1) pesquisas mostrando existir um evidente aumento do metabolismo nos pombos curados pela vitamina B_1 e insistindo no papel desta nas oxidações.

Tivemos oportunidade de apresentar ao XV Congresso Internacional de Fisiologia e de publicar, em seguida (3), resultados que mostram ser o fenomeno da elevação do metabolismo dependente exclusivamente do aproveitamento do arroz que se achava estagnado no papo paralisado no beriberi e restabelecido em seus movimentos no animal curado. Nos animais em que o papo se acha vasio não ha aumento de metabolismo na cura pela vitamina.

Esses resultados foram tambem corroborados pelo estudo do metabolismo dos musculos isolados de animais beribericos e curados,

que mostraram não haver diferença de intensidade respiratoria entre os musculos de animais doentes e curados, mas sim entre os dos animais em inanição e os alimentados (11).

Deixando pois de lado a teoria de ABDERHALDEN e HESS, tivemos a nossa atenção voltada para um interessante fenomeno que PETERS e colaboradores haviam verificado: o acumulo de acido lactico nas zonas inferiores do encefalo de pombos, quando apresentavam os sintomas nervosos tipicos da avitaminose B_1 (14).

Procurando verificar com FLORENCE se entre os fenomenos havia relação de causa e efeito, conseguimos em aves normais, aumentando pela asfixia o teor em acido lactico nessas zonas, fazer aparecer fenomenos nervosos semelhantes aos do beriberi (6 e 10).

Partindo desses resultados, desde logo verificamos, ainda com FLORENCE, existir no beriberi, nas zonas em questão (lobos opticos e pedunculos cerebrais das aves) uma diminuição da capacidade em oxidar o acido lactico, revelada pela técnica do azul de metileno.

Uma nota previa desse resultado foi apresentada em 16 de Janeiro de 1932, á Soc. de Medicina e Cirurgia de São Paulo (7); posteriormente os resultados foram publicados in extenso (8 e 9).

Desejamos aqui chamar a atenção para o fato de que sómente seis mezes após a nossa nota previa, mas independente dela, é que PETERS e colaboradores (13) verificaram ser o consumo de oxigenio nessas zonas menor nos pombos beribericos do que nos normais, quando ambos eram adicionados de lactato.

Deixamos propositadamente de lado a discussão do posterior desenvolvimento dado por PETERS e outros autores a esta questão. Ela será feita numa proxima publicação nossa.

Partindo da interessantissima demonstração de MARTINO (15 e 16) e de POPA e POPA (17) de que é nos lobos opticos das aves que se encontram os centros correspondentes funcionalmente aos centros sensitivo-motores cerebrais dos mamiferos, tivemos por objetivo, no presente trabalho, verificar se a localização da citada lesão quimica não se encontraria, para os mamiferos, na zona motora cerebral.

PARTE EXPERIMENTAL

As experiencias foram feitas em galinhas e em ratos, normais e em avitaminose B_1 aguda. Esta era provocada pela alimentação com arroz polido para as galinhas e pela dieta de SHERMAN e SANDELS (18) para os ratos. As galinhas apresentavam os fenomenos nervosos classicos de opistotono, emprostotono, pleurostotono e contratura das per-

nas. Nos ratos os fenomenos observados foram os muitas vezes descritos: paralisia e contratura das patas, movimentos em tonel, movimento de balanço, opistotono e pleurostotono, etc., na maioria dos casos apresentando-se com grande intensidade. Tambem foram estudados os animais que não apresentaram sintomas.

As medidas da respiração foram executadas pelo metodo manometrico de WARBURG, empregando-se para isso cinco manometros, cujo espaço gazoso era exatamente determinado por pesagem do mercurio necessario para enchê-lo. As constantes eram determinadas segundo WARBURG. Seguimos em seus detalhes a técnica indicada por este autor (19), usando apenas as cubas por ele empregadas em 1924 (20). O gaz carbonico era absorvido por meio de potassa a 5 %, que embebia um pequeno cône de papel de filtro, colocado no cône terminal do capilar do manometro (inclusive no termobarometro).

Para determinar a capacidade da oxidação do acido lactico comparava-se a respiração da polpa do tecido (O^2 residual) com a da mesma quando adicionada de lactato de sodio (O^2 lactato). O encefalo era dividido em duas partes: cerebro e istmo do encefalo; no caso dos ratos, do cerebro só se empregava, depois de desprezar o lobo olfatorio, o terço anterior, onde estão localisados os centros motores principais para o rato (2). No caso das galinhas empregava-se todo o cerebro. O cerebelo não foi investigado em caso algum.

Os tecidos eram esmagados e bem homogeneisados, separadamente, sobre espatulas aquecidas a 40°, nas quais se colocava uma gota de Ringer. Mediamos o consumo de oxigenio sem adição e com adição de lactato, tanto para a polpa de cerebro como para a do istmo. Para isso, cada uma das polpas era dividida em duas partes, colocadas nas cubas do aparelho de WARBURG, respetivamente com 1 cc. de Ringer e com 0,9 cc. de Ringer mais 0,1 cc. de lactato de sodio $M/_2$. Além dessas 4 cubas com tecidos, empregavamos uma (destinada a funcionar como termobarometro) sómente com 1 cc. O Ringer era o indicado por WARBURG, pobre em bicarbonato. Em seguida, as cubas eram ligadas aos monometros e mergulhadas no termostato. Da ocasião da decapitação até este momento decorriam cerca de 15 minutos. Usavamos 134 agitações por minuto. Termostato mantido a 40°. Deixavamos decorrer 15 minutos para igualar a temperatura. As experiencias duravam em geral 2 horas. Terminada a experiencia, o conteúdo das cubas e as aguas de lavagem eram lançadas em pesa-filtros tarados. Estes, depois de secados a 95°, durante mais de 12 horas, eram pesados ao 0,01 mg.. O peso do tecido era obtido depois de subtraído o peso dos sáis do Ringer e do lactato, quando adicionado. Era cal-

culada a quantidade de lactato, que poderia ter sido oxidada durante a experiencia, sendo ela levada em conta, sempre que significativa.

No caso dos ratos o consumo de oxigenio para cada 15 minutos foi referido ao miligrama de tecido seco. Obtinhamos assim os pontos experimentais com os quais construimos os nossos graficos. Para o caso das galinhas registramos apenas o consumo total em 2 horas.

RESULTADOS

Relataremos primeiramente os dados obtidos no cerebro, depois os obtidos com o istmo do encefalo (*).

CEREBRO — a) Nos animais normais, nas galinhas (tab. 1) ou ratos (grafico 1) verificou-se perfeitamente nitido o acrescimo do consumo do oxigenio — *extra* O^2 — pela adição do lactato, mostrando a oxidação dessa substancia.

b) Nos animais em avitaminose B_1 — foi encontrada uma diferença fundamental entre os resultados obtidos nas galinhas e nos ratos.

TABELA 1

mmc. por mgr. seco — 2 h.

N.º	O^2 Residual	O^2 Lactato	O^2 Extra
1	11,3	12,7	1,4
2	10,8	13,0	2,2
3	8,1	11,4	3,3
4	7,9	9,8	1,9
5	7,7	12,2	4,5
6	5,5	10,0	4,5
Media	8,5	11,5	3,0

No cerebro das galinhas apresentando sintomas nervosos de avitaminose B_1 não se evidenciou baixa do extra O^2, exceto em dois casos (tab. 2).

TABELA 2

mmc. por mgr. seco — 2 h.

N.º	O^2 Residual	O^2 Lactato	O^2 Extra
1	12,2	11,2	— 1,0
2	11,7	13,4	1,7
3	9,4	11,4	2,0
4	10,0	15,2	5,2
5	10,3	10,7	0,4
6	8,9	11,4	2,5
7	9,7	11,8	2,1
8	9,8	11,0	1,2
9	6,8	9,1	2,3
Media	9,9	11,7	1,8

(*) Uma parte dos resultados aqui apresentados foram publicados anteriormente em (12).

Nos ratos, que apresentavam sintomas tipicos, verificou-se uma enorme baixa e até anulação do extra oxigenio, na zona motora cerebral (grafico 2 e 3).

Naqueles ratos, porém, em que a avitaminose decorreu sem sintomas nervosos o extra O^2 aí se encontrava normal (grafico 4) e como adiante se verá a perturbação foi encontrada no istmo do encefalo.

ISTMO DO ENCEFALO — a) Nos animais normais tambem se verificou aqui, como no cerebro, nitidos aumentos de respiração, pela adição do lactato (tabela 3 e grafico 5), aliás tambem perceptiveis desde os primeiros minutos da experiencia.

TABELA 3

mmc. por mgr. seco — 2 h.

N.o	O^2 Residual	O^2 Lactato	O^2 Extra
1	5,6	7,2	1,6
2	6,5	8,8	2,3
3	6,4	9,0	2,6
4	5,7	8,3	2,6
5	5,4	6,8	1,4
6	4,7	7,1	2,4
7	5,5	7,4	1,9
Media	5,7	7,8	2,1

b) Nos animais em avitaminose B_1, ha que distinguir entre os fenomenos presentes nas galinhas e nos ratos.

Nas galinhas com contratura continua uma nitida baixa do extra O^2 se manifestou em todos os casos (tabela 4), nunca alcançando este o mais baixo extra O^2 normal. Nas galinhas sem sintomas o extra O^2 foi encontrado normal.

TABELA 4

mmc. por mgr. seco — 2 h.

N.o	O^2 Residual	O^2 Lactato	O^2 Extra
1	5,0	6,2	1,2
2	5,9	6,8	0,9
3	5,5	6,4	0,9
4	5,6	5,2	-0,4
5	6,1	7,2	1,1
6	5,1	6,1	1,0
7	5,5	5,9	0,4
Media	5,5	6,3	0,8

Nos ratos com sintomas nervosos tipicos o aumento da respiração do istmo do encefalo provocado pelo lactato se mostrou normal, com exceção de um caso (grafico 6).

Os ratos sem sintomas nervosos que, como vimos, apresentaram um extra O^2 normal no cerebro, mostraram no istmo do encefalo uma enorme baixa do extra O^2 (grafico 7).

No grafico 8 estão representados os extra-oxigenio do encefalo de galinhas normais e beribericas, com as respectivas médias.

DISCUSSÃO E CONCLUSÃO

Conforme se depreende dos resultados acima expostos, conseguimos estabelecer uma relação entre a existencia dos sintomas nervosos tipicos da avitaminose B_1 aguda e a localisação da lesão quimica, verificada em trabalhos anteriores. Os fenomenos nervosos se apresentam quando a perturbação existe na zona motora central: no cerebro, para os mamiferos e no istmo do encefalo, para as aves.

A falta da vitamina B_1 é a causa dessa lesão quimica. Entre outras, temos a demonstração direta de PETERS, ao restabelecer o consumo de oxigenio ao nivel normal pela adição de vitamina «in vitro», em presença de lactato (13).

Esta lesão, por si só, explica o aparecimento dos fenomenos nervosos, pois a administração de vitamina consegue curá-los, muitas vezes em menos de uma hora.

Este fáto inocenta a lesão anatomo-patologica dos nervos verificada no beriberi, aliás tambem encontrada na inanição, de qualquer responsabilidade na produção desses fenomenos.

Podemos imaginar que as coisas se passam da seguinte maneira: a vitamina B_1 é indispensavel á oxidação do acido lactico no sistema nervoso central. Na avitaminose B_1 o aparecimento da lesão quimica pode se dar indiferentemente em qualquer uma de suas partes. Quando a localisação da lesão for na zona motora, dar-se-á o desencadeamento dos fenomenos nervosos tipicos; quando não, a avitaminose decorrerá silenciosa.

EXPLICAÇÃO DOS GRAFICOS 1 a 8: Em abcissa — tempo em minutos.
———— O^2 Sem adição; — — — — — O^2 Com adição de lactato.
Grafico 1 — Cerebro de rato normal
» 2 e 3 — Cerebro de rato beriberico com sintomas
» 4 — Cerebro de rato beriberico sem sintomas
» 5 — Istmo do encefalo de rato normal
» 6 — Istmo do encefalo de rato beriberico com sintomas
» 7 — Istmo do encefalo de rato beriberico sem sintomas
» 8 — Comparação entre os extra O^2 do encefalo de galinhas normais e em avitaminose B_1, com sintomas.

GRAFICO 1

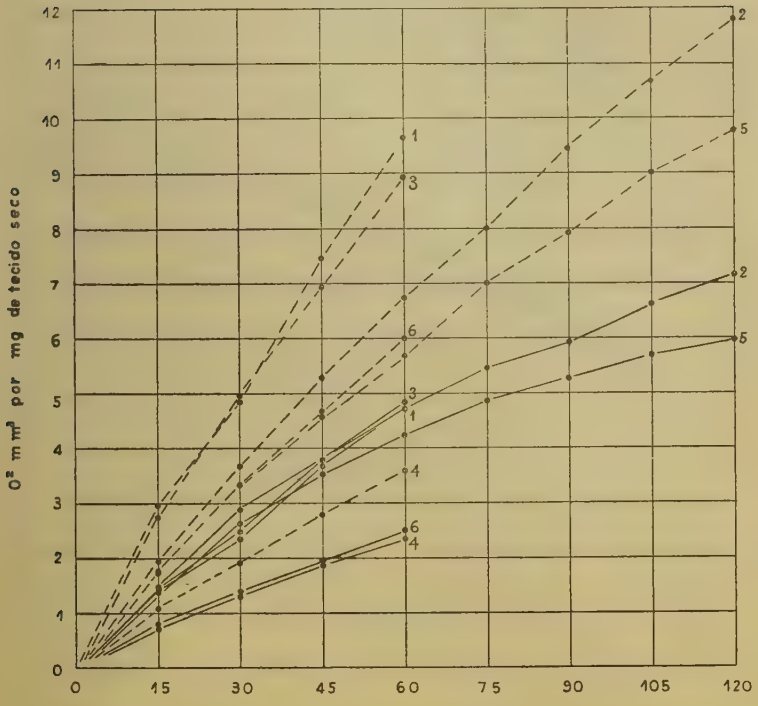


GRAFICO 2

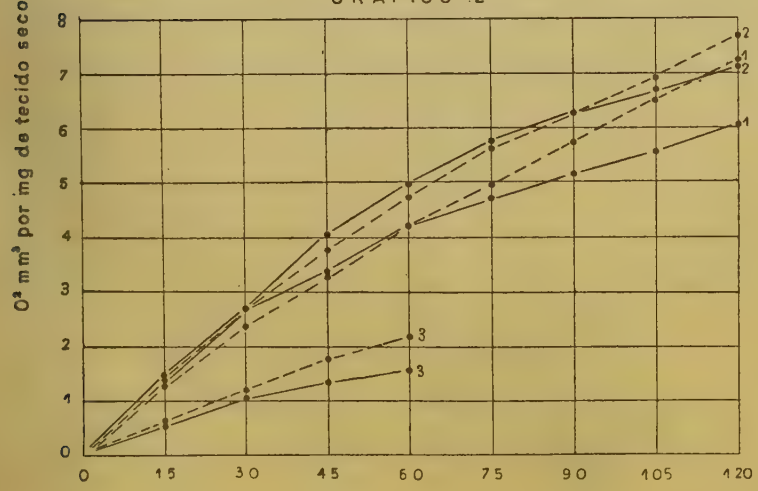


GRAFICO 3

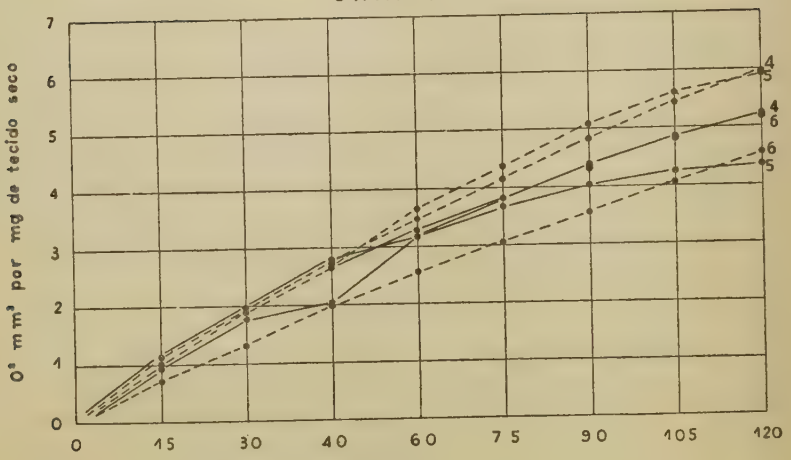


GRAFICO 4

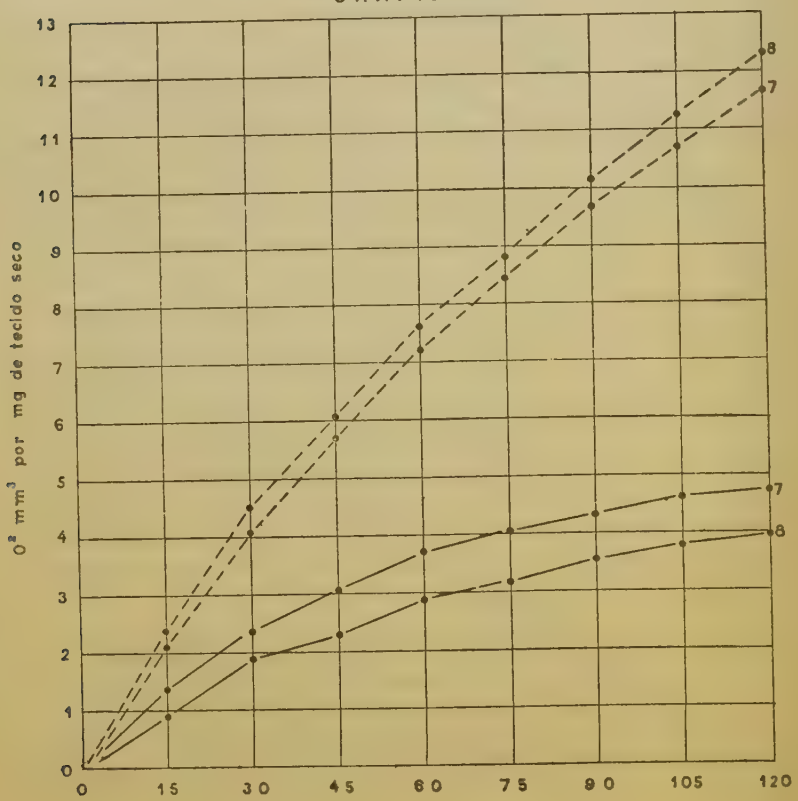


GRAFICO 5

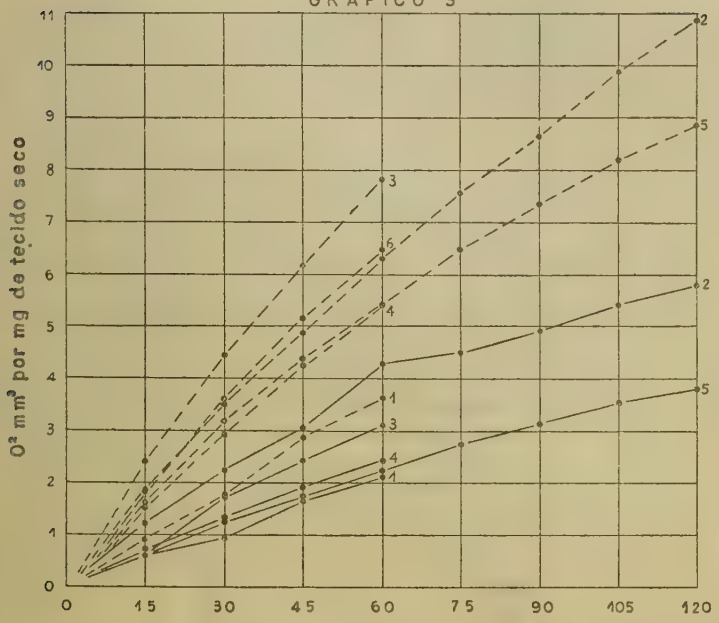


GRAFICO 6

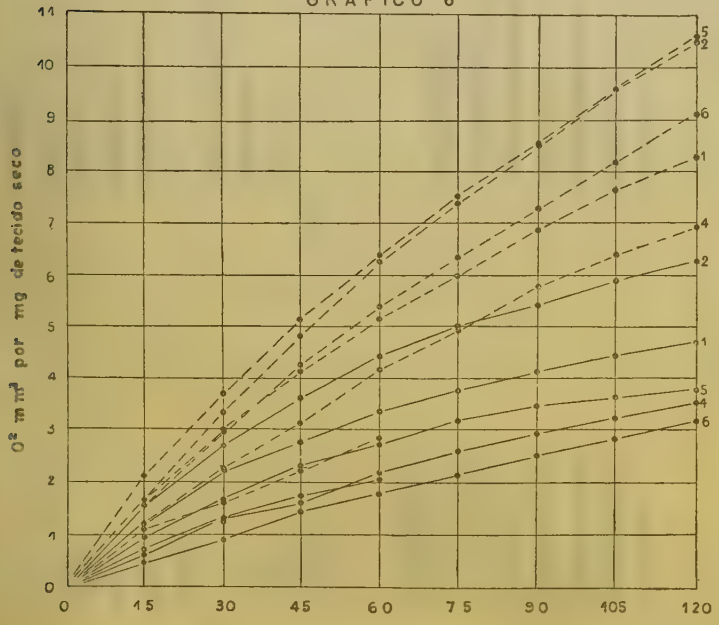


GRAFICO 7

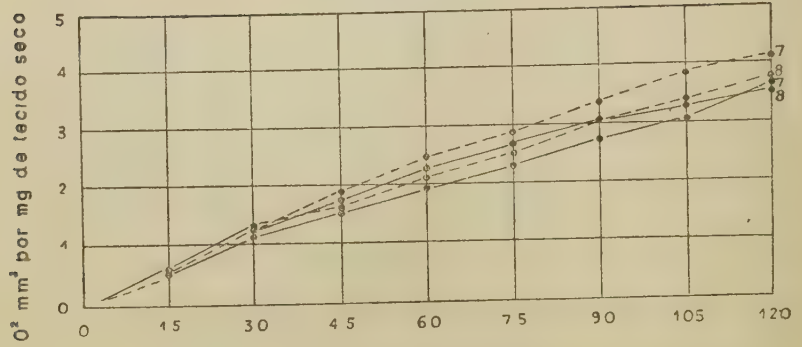
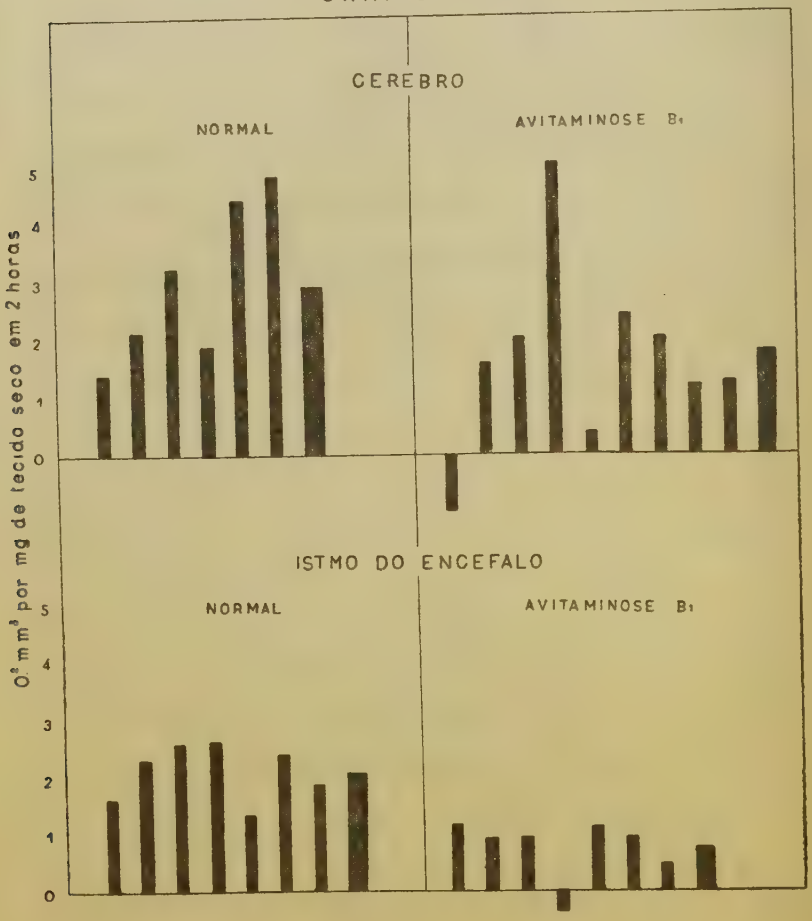


GRAFICO 8



ON THE OXYDATION OF LACTIC ACID IN THE BRAIN OF ANIMALS BOTH NORMAL AND IN B_1 - AVITAMINOSIS.

LOCALISATION OF THE CHEMICAL LESION IN MAMMALS AND BIRDS.

Abstract

In January 1932 one of us (7), with the collaboration of FLORENCE, *had the opportunity of presenting a preliminary notice in which it was concluded that there exists a diminution of oxydation of the lactic acid in cases of avian beriberi in certain regions of the encephalum (optic lobes and cerebral peduncles). Our results, that were later published in detail (8, 9), were obtained by verifying that the acceleration of the reduction of the methylene blue, produced by the lactate, that is very pronounced in normal fowls, is entirely absent or greatly reduced in these encephalic regions of fowls presenting the nervous symptoms of experimental beriberi. In the cerebrum this phenomenon is much less pronounced. Only six months after the presentation of our preliminary note, but independently from it,* GAVRILESCU, MEIKLEJOHN, PASSMORE *and* PETERS *(13) verified that the consumption of oxygen in the same regions of the brain is less in pigeons suffering from beriberi than in normal ones, when lactate was administered to both. Starting from the very interesting verification made by* MARTINO *(15, 16) and* POPA *and* POPA *(17) that in the optic lobes of the birds are found the centers corresponding to the cerebral sensory motor centers of the mammals, our object in the present work was to verify if the localisation of the above mentioned chemical lesion would not be found, in the case of the mammals, in the motor zone of the cerebrum.*

The experiments were made with fowls and with rats, both normal and in avitaminosis B_1. Animals with and without symptoms were used. A measure has been made of the O_2 consumptions by minced tissue added with sodium lactate as compared with same without any addition. WARBURG'S *manometric method was employed the anterior third from rats' cerebrum where the motor centers lie (2), was the only part used.*

First we shall discuss the results obtained in the cerebrum, afterwards those obtained with the isthmus of the encephalum.

CEREBRUM — *a) In normal animals, fowls (table 1) or rats (graph 1) an increase of the consumption of oxygen — extra O_2 — was very clearly verified by the addition of the lactate.*

b) In animals with avitaminosis B_1 — there was found a fundamental difference between the results obtained in fowls and in rats. In the brain of the fowls, presenting or not the nervous symptoms of avitaminosis B_1, no decrease of the extra O_2 was found, except in

two cases (tab. 2). In rats that presented typical symptoms there was found a large decrease and even the entire absence of the extra oxygen, in the cerebral motor region (graph 2 and 3). In those rats, however, in which the avitaminosis occurred without nervous symptoms the extra O_2 *was there normal (graph 4) and, as there will be seen further, the perturbation was found in the isthmus of the encephalum.*

ISTHMUS OF THE ENCEPHALUM — *a) In normal animals there was also verified here, like in the cerebrum a clear rise of the respiration by the addition of lactate (tab. 3 and graph 5), also already noticeable during the first minutes of the experiment.*

b) In animals in avitaminosis B_1 *there should be distinguished between the phenomena present in the fowls and in the rats. In fowls with continual contraction, a clear decrease of the extra* O_2 *was observed in all cases (tab. 4). In fowls without symptoms the extra* O_2 *was normal. In the rats with typical nervous symptoms the increase of the respiration of the isthmus of the encephalum provoked by the lactate was normal, with the exception of one case (graph 6). In the rats without nervous symptoms which, as we have seen, presented an extra normal* O_2 *in the brain, showed in the isthmus of the encephalum an enormous decrease of the extra* O_2.

As can be seen from the results related above, we could establish a relation between the existence of the typical nervous symptoms of the avitaminosis B_1 *and the localisation of the chemical lesion, verified in former experiments. The nervous phenomena appear when the perturbation exists in the central motor region: in the cerebrum for the mammals and in the isthmus for the birds.*

We may imagine that the facts run in the following way:

The vitamine B_1 *is indispensable for the oxydation of the lactic acid in the central nervous system. In the avitaminosis* B_1 *the appearing of the chemical lesion may occur indifferently in any region of the central nervous system. When the localization of the lesion happens to be in the motor region, there will occur the typical nervous phenomena, when not, the avitaminosis develops silently.*

BIBLIOGRAFIA

1 — Abderhalden, E. und Wertheimer, E. — 1932 — Das Wesen der Wirkung des Vitamin - B - Komplexes, *Pflügers Arch.*, Berlim. **230**, 155-160.

2 — Ferrier, D. — 1913 — Citado no «Winterstein's Handbuch vergleichender Physiologie». **4**, 442.

3 — Galvão, P. E. — 1937 — Über die Wirkung des Vitamin - B - Komplexes auf den Gesamtstoffwechsel beim experimentellen Beriberi. *Pflügers Arch.*, Berlim, **233**, 131-135.

4 — Galvão, P. E. e Cardoso, D. M. — 1930 — Estudos sobre as oxydações na avitaminose B e no jejum. *Arch. Inst. Biol.*, S. Paulo. **3**, 219-248.

5 — Galvão, P. E. und Cardoso, D. M. — 1932 — Über die Oxydationen bei der Avitaminose B und im Hungerzustand. *Pflügers Arch.*, Berlim. **229**, 422-438.

6 — Galvão, P. E. e Florence, C. H. — 1932 — Phenomenos nervosos analogos aos da avitaminose B_1, provocados pela asphyxia. Communicação á Sociedade de Medicina e Cirurgia de S. Paulo. (Semana do Laboratorio) em 16 de Janeiro, cf. resumo in «*Annaes Paulistas de Medicina e Cirurgia*», **3**, 201.

7 — Galvão, P. E. e Florence, C. H. — 1932 — Oxydação do acido lactico pelo encephalo de animaes normaes e em avitaminose B. Communicação á Sociedade de Medicina e Cirurgia de S. Paulo (Semana do Laboratorio), em 16 de Janeiro, cf. resumo in «*Ann. Paulistas de Med. e Cirurgia.* **3**, 201.

8 — Galvão, P. E. und Florence, C. H. — 1934 — Über die Milchsäureoxydation im Gehirn von Hühnern in Avitaminose B. *Pflügers Arch.*, Berlim. **233**, 714-721.

9 — Galvão, P. E. e Florence, C. H. — 1935 — Sobre a oxydação do acido lactico no encephalo de gallinhas em avitaminose B. *Arch. Inst. Biol.*, S. Paulo. **6**, 155-165.

10 — Galvão, P. E. e Florence, C. H. — 1935 — Phenomenos nervosos analogos aos da avitaminose B_1, provocados pela asphyxia. *Arch. Inst. Biol.*, S. Paulo. **6**, 201-204.

11 — Galvão, P. E. und Pereira J. — 1936 — Ueber die Wirkung des Vitamin -B- Komplexes auf die Muskelatmung beim experimentellen Beriberi. *Hoppe-Seyler's Zeits.*, Berlim und Leipzig. **245**, 19-22.

12 — Galvão, P. E. und Pereira J. — 1936 — Über den Einfluss der Milchsäure auf die Gehirnatmung der Säugetiere bei Avitaminose B_1. *Bioch. Zeits.*, Berlim. **289**, 136-142.

13 — Gavrilescu, N., Meiklejohn, A. P., Passmore, R. and Peters, R. A. — 1932 — Carbohydrate Metabolism in Birds. *Proc. Roy. Soc.*, London. **110**, 431-447.

14 — Kinnersley, H. W. and Peters, R. A. — 1930 — Carbohydrate metabolism in birds. *Biochem. Journ.*, London. **24**, 711-722.

15 — Martino, G. — 1926 — Contributo alla conoscenza della funzione dei lobi ottici nel colombo. *Arch. di Fisiol.*, Firenze. **24**, 1.

16 — Martino, G. — 1930 — Comportamento dei glicidi di vari segmenti centrali nei colombi stricnizzati. *Arch. di Fisiol.*, Firenze. **29**, 274-277.

17 — Popa, G. T. and Popa, G. F. — 1933 — Certain Functions of the Midbrain in Pigeons, *Proc. Roy. Soc.*, London. **113**, 191-195.

18 — Sherman, H. C. and Sandels, M. R. — 1931 — Further experimental differenciation of vitamins B and G. *Journ. of Nutrition,* Springfield, Illinois, **3**, 395-409.

19 — Warburg, O. — 1923 — Versuche am überlebenden Carcinomgewebe (Methoden) *Bioch. Zeits.*, Berlim, **142**, 317-333.

20 — Warburg, O. — 1924 — Verbesserte Methode zur Messung der Atmung und Glykolyse. *Bioch. Zeits.*, Berlim. **152**, 51-63.

Vol. 9 — Art. 4 Agosto de 1938

MODIFICAÇÃO DO METODO PERMANGANICO-IODOMETRICO PARA A DOSAGEM DO ACIDO LACTICO

POR

P. E. Galvão, C. H. Florence e J. Pereira

Do Instituto Biologico de S. Paulo

Com 1 figura no texto

Entre os metodos de dosagem do acido lactico, destaca-se pela sua precisão o de FRIEDMANN, COTONIO e SCHAFFER (1), modificado por FRIEDMANN e KENDALL (2). Consiste, essencialmente, em oxidar essa substancia para acetaldeído em meio acido e em presença do sulfato de manganez, que acelera a reação, impedindo a superoxidação. A oxidação é feita á temperatura da ebulição por adição gradual de permanganato de potassio ou bioxido de manganez. Os produtos formados são acarretados por meio de uma corrente de ar atravez um refrigerante do tipo Hopkins, bem resfriado, onde se condensam os corpos menos volateis que o produto da oxidação do acido lactico: o acetaldeído, tornando-se assim o metodo quasi especifico para a substancia em questão. A corrente de ar, após a passagem no refrigerante, borbulha numa torre carregada com solução de bisulfito de sodio, com o qual se combina o acetaldeído. Depois de posto em liberdade pelo bicarbonato de sodio, o bisulfito que se achava combinado é dosado iodometricamente.

Os erros cometidos pelos autores do metodo, verificados com solução conhecida de l a c t a t o d e z i n c o p u r o, chegam a ser de 3-5 % para quantidade de 0,04 mg. a 45 mg.

Erros como esses são insignificantes no seu valor absoluto, quando as quantidades a dosar são pequenas; mas tratando-se de alguns miligramas, os erros assumem valores tais que tornam o metodo inadequado a uma pesquisa exata.

Como tivessemos necessidade de um metodo que nos desse um erro absoluto maximo de 0,05 mg. para quantidades até 5 mg., resolvemos modificar o aparelho e a tecnica.

Após inumeras experiencias considerámos essencial:

1.º) Manter a temperatura do refrigerante acima, mas não excessivamente, do ponto de ebulição do acetaldeído (20º,8). Com isso se permite a passagem de t o d o o acetaldeído e limita-se a de substancias outras, capazes de se combinar com o bisulfito, bem como a oxidação deste pela passagem do ar não suficientemente refrigerado.

2.º) Usar um dispositivo que permita a divisão da corrente de ar que acarreta o acetaldeído, em bolhas pequenissimas, de modo a facilitar a combinação deste com o bisulfito.

3.º) Empregar a solução de bisulfito sob pequeno volume, para tornar mais exata a titulação iodometrica final.

DESCRIÇÃO DO APARELHO

O aparelho por nós modificado, baseado nos pontos acima expostos, consiste (fig. 1) num balão de oxidação *B* de 500 cc. munido de um tubo *a*, que se prolonga até o fundo. Este serve para gotejar o permanganato e aspirar o ar que, borbulhando através a massa liquida, regulariza a ebulição e facilita o acarretamento do acetaldeído. De outro lado o balão está em comunicação com um refrigerante do tipo Hopkins *R*, de 35 cm. de comprimento com refrigeração tambem externa. Para isso a agua, que circula no tubo interior de refrigeração, passa depois por uma manga colocada externamente. O espaço gazoso, compreendido entre as paredes refrigeradas, mede cerca de 3 mm. de espessura.

Antes de chegar ao refrigerante a agua, circulando numa serpentina *S*, é mantida a 21º C., controlada pelo termometro *T*. O ar ambiente não deve estar abaixo de 19º. Regula-se, durante a dosagem, a velocidade da agua e a aspiração do ar de tal modo, que este, ao sair do refrigerante, tenha uma temperatura compreendida entre 24º,5 e 30º, que pode ser controlada pelo termometro *t*.

Para absorção do acetaldeído substituimos a torre primitiva por um cadinho filtrante (Jena 1G-3) (1) *C*, tapado na extremidade superior por uma rolha de borracha, atravessada por um tubo de vidro. Este é ligado a uma trompa de agua, estabelecendo-se uma corrente de ar que pelo tubo *a* borbulha através do liquido em oxidação, passa pelo refrigerante e divide-se, ao atravessar a placa porosa do cadinho, em bolhas finissimas, que sobem em colunas através a solução de bisulfito, aí contida.

O aparelho é todo de vidro Jena. As conexões são de borracha comum excepto a rolha *r* que é de borracha pura.

TECNICA

A solução de lactato colocada no balão *B*, é adicionada de 4 cc. da solução de acido fosforico (135 cc. do acido xaroposo para um litro), 10 cc. da solução de sulfato manganoso a 10 % e agua distilada para completar cerca de 100 cc., segundo FRIEDMANN e colaboradores.

(1) O emprego desse cadinho foi-nos sugerido em 1931 por M. Bolognani, nosso preparador, que tomou parte muito ativa na execução deste trabalho.

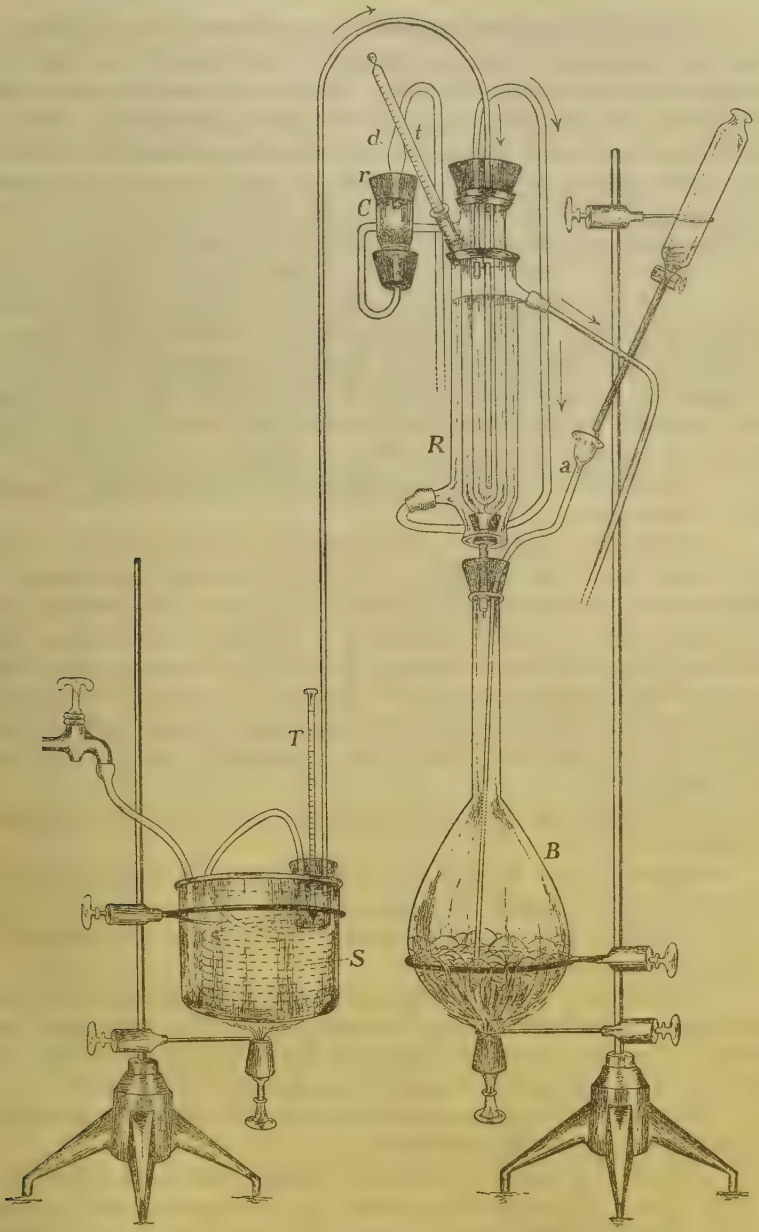


Fig. 1

No cadinho filtrante medem-se, rapidamente, cerca de 5 cc. de bisulfito de sodio a 1,5 % (1), adapta-se imediatamente a rolha *r*, e a aspiração que se estabelece evita a filtração do bisulfito pelos poros do cadinho. Antes deste ser posto em posição, enxuga-se o pouco de bisulfito que possa ter transudado durante essa manipulação. Regula-se a intensidade da aspiração de modo tal que a rolha *r* seja apenas atingida pelas particulas do bisulfito. A dilatação *d* retém o liquido que ocasionalmente possa penetrar no tubo de aspiração.

Aquece-se o balão até a fervura. Para iniciar a oxidação, muito lenta a principio, pingam-se com cuidado pelo tubo *a*, 20 cc. da solução, aproximadamente N/100 de permanganato de potassio, durante cerca de 5 minutos. Em seguida gotejam-se durante 10 minutos mais 20 cc. de permanganato proximamente N/10. A adição deve ser lenta, evitando-se qualquer excesso, facil de constatar pela coloração do liquido. No fim da oxidação chega-se a uma côr castanha bem pronunciada.

Continúa-se o arejamento durante 10 minutos para acarretar todo o acetaldeído.

Destaca-se o cadinho e deixa-se filtrar o bisulfito através a porcelana para dentro de um *beaker*. Com 2 cc. lava-se a dilatação *d* e deixa-se escoar para dentro do cadinho. Com mais 2 cc. lava-se a face inferior da rolha *r* e escoa-se tambem para dentro do cadinho. Com esses liquidos, lavam-se as paredes do cadinho e por ar comprimido são eles filtrados através a placa de porcelana para o *beaker* de titulação. Lava-se o cadinho mais 3 vezes com 2 cc. de agua que são tambem filtrados através da placa porosa, assegurando assim a sua completa lavagem.

Verificamos que com essas lavagens todo o bisulfito passa para o *beaker*.

O volume total de liquido a ser titulado com a adição de 1 cc. de amido perfaz o volume de cerca de 16 cc.

A titulação faz-se imediatamente ou o *beaker* é guardado na geladeira até ser titulado.

Neutraliza-se o excesso de bisulfito com solução de iodo aproximadamente N/10 até pequeno excesso, que é feito desaparecer por adição de algumas gotas de tiosulfato aproximadamente N/50. Pela adição de iodo N/100 faz-se aparecer um ligeiro tom de azul.

Com cerca de 1 grama de bicarbonato de sodio, liberta-se então o bisulfito combinado ao acetaldeído.

Agitando o *beaker*, vae-se adicionando com uma microbureta o iodo N/100, rigorosamente titulado, até o reaparecimento do tom

(1) A solução de bisulfito é preparada no mesmo dia. Para isso faz-se passar uma corrente de SO^2 através uma solução da $Na^2 CO^3$, até o aparecimento de um tom esverdinhado. 6cc. dessa solução diluidos a 100cc., dão uma solução de 1,5 % de bisulfito, aproximadamente.

azul inicial, que deve permanecer cerca de 1-2 minutos, sendo esse o ponto final da reação. 1 cc. desse iodo equivale a 0,45 mg. de acido lactico.

Da quantidade de iodo N/100 consumida, subtraem-se 0,05 cc., média de varias dosagens em branco, aliás muito concordantes.

Precisão obtida com os lactatos de litio e de zinco — Nas condições acima descritas, o aparelho é capaz de dosar o lactato de litio e o de zinco com notavel precisão, sendo o erro cometido, só excepcionalmente maior do que 0,03 mg.

O lactato de litio é preparado neutralisando o d,l-acido lactico purissimo, diluido com o mesmo volume de agua, pelo carbonato de litio purissimo, em presença de vermelho de fenol. A solução é concentrada por ebulição e resfriada para obtenção dos cristais. Recristalisa-se uma vez.

Na tabela n.º 1 estão expressos os resultados obtidos com quantidades variando entre 4,35 e 0,09 miligramas.

TABELA 1
Test com lactato de litio
Ótimo de Temperatura

Teorico em acido lactico (mgrs.)	Dosado	ERRO		Teorico em acido lactico (mgrs.)	Dosado	ERRO		Teorico em acido lactico (mgrs.)	Dosado	ERRO	
		Absoluto (mgrs.)	Relativo			Absoluto (mgrs.)	Relativo			Absoluto (mgrs.)	Relativo
	4,33	— 0,02	— 0,5 %		4,35	0,00	0,0 %	2,17	2,18	+ 0,01	+ 0,4 %
	4,34	— 0,01	— 0,2 %		4,33	— 0,02	— 0,5 %		2,18	+ 0,01	+ 0,4 %
	4,35	0,00	0,0 %		4,38	+ 0,03	+ 0,7 %		1,10	+ 0,01	+ 0,9 %
	4,35	0,00	0,0 %		4,26	— 0,09	— 2,1 %		1,11	+ 0,02	+ 1,8 %
	4,32	— 0,03	— 0,7 %		4,30	— 0,05	— 1,1 %		1,08	— 0,01	— 0,9 %
4,35	4,36	+ 0,01	+ 0,2 %	4,35	4,37	+ 0,02	+ 0,5 %	1,09	1,11	+ 0,02	+ 1,8 %
	4,26	— 0,09	— 2,1 %		4,36	+ 0,01	+ 0,2 %		1,11	+ 0,02	+ 1,8 %
	4,38	+ 0,03	+ 0,7 %		4,36	+ 0,01	+ 0,2 %		1,12	+ 0,03	+ 2,7 %
	4,32	— 0,03	— 0,7 %		4,38	+ 0,03	+ 0,7 %				
	4,34	— 0,01	— 0,2 %		4,32	— 0,03	— 0,7 %	Media	1,10		
	4,32	— 0,03	— 0,7 %		4,36	— 0,03	+ 0,2 %	0,43	0,42	— 0,01	— 2,3 %
	4,34	— 0,01	— 0,2 %	Media	4,34			0,22	0,25	+ 0,03	+ 13,6 %
									0,09	0,00	0,00 %
									0,10	+ 0,01	+ 11,1 %
								0,09	0,09	0,00	0,0 %
									0,09	0,00	0,0 %
								Media	0,09		

Em toda esta série de 37 dosagens, feitas em dias diferentes e sem despresar nenhum resultado, o erro não excedeu 0,03 mg., com exceção de 3 casos em que, provavelmente por causa fortuita, o erro atingiu 0,05-0,09 mg.

Chamamos a atenção para o fato de ser o erro absoluto independente da quantidade do lactato empregado. Assim, ele foi, em média, de 0,00-0,01 mg. para quantidades variando de 4,35 até 0,09 mg. Por isso mesmo o erro relativo cresce inversamente ás quantidades dosadas, como se verifica na tabela.

A mesma precisão se obtem com o lactato de zinco (tabela 2) preparado e recristalisado segundo FRIEDMANN e KENDALL.

TABELA 2

Test com lactato de Zinco
Ótimo de Temperatura

Teorico em acido lactico (mgrs.)	Dosado (mgrs.)	ERRO	
		Absoluto (mgrs.)	Relativo
	4,19	— 0,02	— 0,5 %
	4,18	— 0,03	— 0,7 %
	4,19	— 0,02	— 0,5 %
	4,20	— 0,01	— 0,2 %
	4,19	— 0,02	— 0,5 %
4,21	4,23	+ 0,02	+ 0,5 %
	4,17	— 0,04	— 0,9 %
	4,18	— 0,03	— 0,7 %
	4,21	0,00	0,0 %
	4,20	— 0,01	— 0,2 %
	4,19	— 0,02	— 0,5 %
Media . .	4,19		
2,11	2,08	— 0,03	— 1,4 %
	0,11	+ 0,01	+ 10,0 %
0,10	0,13	+ 0,03	+ 30,0 %
	0,13	+ 0,03	+ 30,0 %
Media . .	0,12		

Papel da temperatura — Se a temperatura da corrente de ar que deixa o refrigerante estiver reduzida a menos de 24°,5, o

rendimento do aparelho cae nitidamente, como se pode observar nos resultados consignados na tabela 3.

Esses foram obtidos com uma temperatura exterior de 15°-16°, marcando o termometro *t* 22°.

Pelo aquecimento do ar ambiente a 19°-20°, o rendimento voltou a ser ótimo, sendo a temperatura marcada por *t*, de cerca de 26°-28°.

TABELA 3

Test com lactato de Zinco

Baixa temperatura

Teorico em acido lactico (mgrs.)	Dosado (mgrs.)	ERRO	
		Absoluto (mgrs.)	Relativo
4,21	4,15	— 0,06	— 1,4 %
	4,16	— 0,05	— 1,2 %
	4,15	— 0,06	— 1,4 %
	4,17	— 0,04	— 0,9 %
Media	4,16		
2,11	2,06	— 0,05	— 2,4 %
	2,09	— 0,02	— 0,9 %
Media	2,07		

Limite do metodo — Nas condições em que operamos o metodo é apropriado para dosar quantidades menores do que 5 mgrs. de acido lactico. Com 6-10 mgrs. o rendimento cae, sendo o erro, porém, menor que 2 %.

Precisão obtida com o lactato de sodio — Com grande surpreza nossa, a solução de lactato de sodio, obtida por neutralisação da soda com d,l-acido lactico, em presença do turnesol, não deu resultados da mesma concordancia que os conseguidos com os lactatos de zinco e de litio, apezar de mantidas as mesmas condições ótimas e executadas as determinações entremeiadamente com as dos referidos lactatos.

Como não conheciamos a quantidade teorica empregada, comparámos os resultados entre si, verificando ser o afastamento, frequente-

mente, muito maior que no caso dos referidos lactatos (tab. 4). O mais grave, porém, é que, ás vezes, obtem-se series bem concordantes, mas subitamente dá-se o aparecimento de numeros discrepantes. A discordancia pode chegar até a 0,2 mg. para quantidade de cerca de 5 mg., se bem que em geral seja muito menor.

O comportamento diferente do lactato de sodio, por nós verificado em centenas de dosagens, em que fizemos variar amplamente as condições de funcionamento do aparelho, não poude ser elucidado.

TABELA 4

Test com lactato de sodio
Ótimo de temperatura

	Dosado (mgrs.)		Dosado (mgrs.)
Solução I Dosada nos dias 1 e 2 de junho	3,32 3,33 3,33 3,31 3,23 3,27 3,32 3,29 3,30 3,31 3,31 3,31 3,31	Solução III Dosada no dia 9 de junho	3,36 3,41 3,37 3,38 3,43 3,46
Solução II Dosada no dia 8 de junho	3,44 3,45 3,47 3,41 3,38 3,35 3,37 3,32 3,34	Solução IV Dosada nos dias 20 e 21 de maio	4,30 4,31 4,31 4,31 4,37 4,28 4,35 4,30 4,32 4,25 4,35 4,63 4,48 4,28 4,47 4,43

DISCUSSÃO

Quando lançámos mão do metodo de FRIEDMANN, COTONIO e SCHAFFER modificado por FRIEDMANN e KENDALL, chamou desde logo a nossa atenção a imperfeição do dispositivo de fixação do acetaldeído.

Após algumas experiencias resolvemos em Outubro de 1931 substituir a torre pelo cadinho filtrante.

Os resultados obtidos, então, dosando o lactato de zinco em pequenas quantidades (0,6-0,06 mgr.) superaram em precisão os do metodo

americano. Esta simples modificação torna o metodo adequado á dosagem exata de lactato de zinco com erro não superior a 0,02 mgr. bem como para a dosagem do acido lactico nos tecidos.

As primeiras dosagens de acido lactico no encefalo de aves normais e em asfixia obtidos desse modo puderam ser apresentados já em 16 de Janeiro de 1932 (4 e 5).

Essa modificação revelou-se, no entanto, insuficiente quando precisámos dosar quantidades mais elevadas de acido lactico.

Centenas de determinações realisadas em diferentes épocas no ano, nos mostraram que, no verão o excésso de bisulfito era grandemente diminuido. Isto é devido provavelmente à oxidação mais rapida pela passagem, através do bisulfito, de ar não suficientemente refrigerado. Tentando obviar esta falha, introduzimos a segunda manga refrigerante, com o intuito de proteger o aparelho das variações de temperatura ambiente. Para controlar a temperatura do ar, que vai passar no bisulfito, introduzimos um termometro no espaço gazoso junto ao tubo em que o ar deixa o refrigerante.

Numerosas dosagens, no entanto, nos mostraram que esta manga por si só não é nitidamente eficaz quando a temperatura ambiente está acima de 24°-25°. De outro lado, nos dias frios verificava-se que embora o excesso de bisulfito encontrado na titulação fosse elevado, a recuperação era incompleta, mormente nas primeiras dosagens, em que o aparelho estava ainda muito frio. Nestas condições uma parte do acetaldeído se condensava, refluindo novamente para o balão.

Partindo destes fátos, resolvemos controlar a temperatura da agua de refrigeração, mantendo-a proxima a 21° C antes de penetrar no aparelho.

Para tanto usamos a serpentina *S*, mergulhada num banho de temperatura adequada. Com todas estas precauções conseguimos manter o termometro *t* variando entre 24,5 e 30°, conforme a estação do ano. Quando porém o ar que penetra no balão está abaixo de 19° verificamos que mesmo com todas as precauções citadas, a temperatura no termometro cái abaixo do limite ótimo minimo, por nós verificado, de 24°,5, com baixa do rendimento. Torna-se então necessario aquecer o ambiente a cerca de 20°.

Com o aparelho assim modificado obtivemos resultados muito mais constantes e erros menores que os encontrados na literatura com qualquer outro metodo. Mesmo quando dosamos lactato de sodio, os erros não são maiores do que os resultados encontrados na literatura para lactato de zinco e de litio.

Nos dispositivos descritos na literatura, o acetaldeído englobado nas grandes bolhas de ar, não tem contacto suficientemente intimo com

o bisulfito destinado a fixa-lo. Daí a constancia da porcentagem de erros obtidos, pois quanto maior fôr a concentração do acetaldeído na bolha de ar, menor será o contacto.

Lieb e Zacherl em 1932 (6) e em 1935 (7) obtiveram uma melhor divisão do ar, no seio do bisulfito empregando uma placa porósa.

O metodo foi criticado por Fuchs (3) mostrando quão imperfeita é a lavagem da placa porósa que devido ao dispositivo adotado retem quantidades apreciaveis de bisulfito. Este autor não confirma a exatidão dos resultados anunciados por Lieb e Zacherl. Mesmo esses resultados são inferiores aos que obtemos, apesar das quantidades dosadas por esses autores serem menores.

O cadinho filtrante usado por nós, repetimos, desde 1931, tem a vantagem de, permitindo uma fixação perfeita do acetaldeído, ser susceptivel de uma completa lavagem por filtração através a placa porósa de todas as aguas de lavagem da rolha e do cadinho.

CONCLUSÕES

1.º) Apresentamos uma modificação do aparelho e metodo de Friedmann, Cotonio, Schaffer e Kendall para que se possa dosar os lactatos de zinco e de litio com erros de poucos centesimos de miligrama, quando se empregam quantidades compreendidas entre 0,1 e 5 miligramas. Para quantidade entre 5 e 10 miligramas o erro não atinge a 2 %.

2.º) Na dosagem do lactato de sodio não foi possivel obter resultados tão precisos. Os numeros, neste caso, podem diferir até de decimos, para quantidades de 5 miligramas, embora em geral a concordancia seja muito maior.

MODIFICATION OF THE PERMANGANATE-IODOMETRIC METHOD FOR THE DETERMINATION OF THE LACTIC ACID.

Abstract

We present a modification of the apparatus and method of Friedmann, Cotonio, Schaffer *and* Kendall *in order to make possible the determination of the zinc and lithium lactates with an error of a few hundredths of milligrams for quantities between 0,1 and 5 mgs. (Tables 1 and 2). For larger quantities the error is not more than 2 %.*

It has not been possible to obtain such exact results when sodium lactate was used.

To obtain such accurate results it is absolutely necessary:

1) To maintain the temperature of the condenser above the boiling point of the acetaldehyde (20°,8), but not exceeding it to much.

In this way all the acetaldehyde is allowed to pass, and the passage of other substances that are capable of combining with the bisulfite is limited, as is also the oxidation of the latter by the passage of insufficiently cooled air.

2) To use a device by means of which the air current is divided into very small bubbles, in order to facilitate the combination of the acetaldehyde with the bisulfite.

3) To employ small volume of bisulfite solution in order to facilitate the final iodometric titration.

The apparatus by us modified, based on the above mentioned points, consists (fig. 1) of an oxidation flask «B» which has a tube «a» that extends to the bottom. This serves to drop in the permanganate and to aspirate the air which, bubbling through the liquid, regulates the ebullition and facilitates the removal of the acetaldehyde. On the other side, the flask is connected with a reflux condenser of the Hopkins type «R», that is also provided with an external refrigeration. For this purpose the water that circulates in the inside condenser tube, afterwards passes by an exterior jacket. The gas space between the refrigerated surfaces measures 3 mm.. The water, before getting to the condenser by circulating through a serpentine «S», is maintained at 21° C, the temperature being regulated by the thermometer «T». The room temperature should not be under 19°. During the determination the speed of the water and the aspiration of the air are regulated, so that, when the latter comes out of the condenser, its temperature is between 24°,5 and 30°, controlled by the thermometer «t». For the absorption of the acetaldehyde a filtrating crucible (Jena 1G-3) «C» is used, which is closed at the upper extremity by a rubber stopper, traversed by a glass tube. This is connected with a water pump, which establishes the air current, that, by means of the tube «a», bubbles through the liquid in oxidation, passes through the condenser and divides, when passing through the porous porcelain plate of the crucible, to form extremely small bubbles, which pass up in columns through the bisulfite solution therein contained.

To the lactate solution placed in the flask «B», is added 4 cc. of the phosphoric acid solution (135 cc. of the syrupy acid to 1 liter of water), 10 cc. of the solution of manganese sulfate at 10 % and sufficient water to bring the volume to about 100 cc.. In the filtrating crucible is measured, rapidly, about 5 cc. of freshly prepared sodium bisulfite solution at 1,5 %, the stopper «r» is immediately inserted, and the aspiration thus established, avoids the filtration of the bisulfite through the pores of the crucible. The small amount of bisulfite that may have transudated during the manipulation is re-

moved. The solution in the flask is heated to ebulition. In order to start the oxidation process, very slow at the beginning, through the tube «a», 20 cc. of the solution, of approximately N/100 potassium permanganate are carefully dropped in «a» during nearly 5 minutes. Afterwards the same process is continued during 10 minutes with 20 cc. more of permanganate approximately N/10. The addition should be made very slowly, avoiding any excess, which is easily verified by the colour of the liquid. At the end of the oxidation a very pronounced chestnut colour is obtained. The aeration is continued for more 10 minutes. The crucible is then detached, the bisulfite filtrate through the porcelain plate into a beaker, after which the crucible, the dilatation «d», and the stopper «r» are carefully washed four times with distilled water which are filtrated through the porous plate, securing thus the thorough washing of the crucible. The volume of the liquid to be titrated is only about 15cc.. The titration should be made immediately, but in case of delay the beaker must be kept on ice until the titration.

BIBLIOGRAFIA

1 — Friedmann, T. E., Cotonio, M. and Schaffer, P. — 1927 — The determination of lactic acid. *Journ. biol. Chem.,* Baltimore, **73,** 335-358.

2 — Friedmann, T. E. and Kendall, A. I. — 1929 — The determination of lactic acid. *Journ. Biol. Chem.,* Baltimore, **82,** 23-43.

3 — Fuchs, H. J. — Apparat zur Milchsäurebestimmung. *Hoppe-Seylers Zeitschr. physiol. Chem.,* Berlim u. Leipzig, **221,** 271-277.

4 — Galvão, P. E. e Florence, C. H. — 1932 — Phenomenos nervosos analogos aos da avitaminose B., provocados pela asphyxia. Comunicação á Sociedade de Medicina e Cirurgia de S. Paulo (Semana do Laboratorio) em 16 de Janeiro. cf. resumo em *Annaes Paulistas de Medicina e Cirurgia,* **3,** 201.

5 — Galvão, P. E. e Florence, C. H. — 1935 — Phenomenos nervosos analogos aos da avitaminose B., provocados pela asphyxia. *Arch. do Inst. Biol.,* S. Paulo, **6,** 201-204.

6 — Lieb, H. und Zacherl, M. K. — 1932 — Ein vereinfachter Apparat zur Bestimmung der Milchsäure. *Hoppe-Seylers Zeitschr. physiol. Chem.,* Berlim u. Leipzig, **211,** 211-216.

7 — Lieb, H. und Zacherl, M. K. — 1935 — Ein vereinfachter Apparat zur Bestimmung der Milchsäure, II. *Hoppe-Seylers Zeitschr. physiol. Chem.,* Berlim u. Leipzig, **231,** 88-91.

BRAZILIAN TINGITOIDEA (HEMIPTERA) (PART IV)*

BY

C. J. Drake and E. J. Hambleton

Iowa State College, Ames, Iowa, U. S. A. and Instituto Biologico, São Paulo

With 2 Figures in the Text, and Plates 9-10

This is the fourth of a series of papers (**) dealing with the superfamily *Tingitoidea* of Brazil. It contains notes on 27 species, 7 of which are described below as new to science. The types of the new species are in the Drake collection, paratypes in collections of both authors.

FAMILY PIESMIDAE

1. *Piesma cinerea* Say

(Plate 10, figures H a and H b)

Marilia, São Paulo, 104 specimens, Jan. 9, 1937, collected on *Amarantus spinosus* L. *(Amarantaceae).* These do not seem to differ specifically from specimens collected in the United States, Canada, Mexico and Central America. Examples are also at hand from Argentina. It is the most widely distributed species of the superfamily *Tingitoidea* in the Western Hemisphere.

FAMILY TINGITIDAE

SUBFAMILY CANTACADERINAE

2. *Phatnoma veroniae,* sp. nov.

(Plate 9, fig. A)

Differs from *P. marmorata* Champion in having much shorter spines on head, much wider humeral angles, slightly less elevated carinae, and boundary nervures between subcostal and discoidal areas less elevated. Discoidal and sutural areas slightly less foliaceous but also uniseriate.

Brownish ochraceous, mottled with black fuscous. Antennae slender, brown, the terminal segment enlarged and black apically. Rostrum very long, reaching beyond second venter. Paranotum convex, tricarinate, expanded laterally and finely areolate at humeri; paranota not quite as wide but more widely dilated before the middle than in *marmorata.* Scutellum exposed. Other characters very similar to *marmorata.*

Length, 4.20 mm.; width, 2.25 mm.

---

* A parte III desta serie tendo sido publicado em inglez, na «Revista de Entomologia», Rio de Janeiro, esta parte IV tambem o é na mesma lingua.

** I. Brazilian Tingitidae (Hemiptera), Rev. Ent. 4, 1934, pp. 435-451, 2 figs. — II. New Brazilian Tingitidae (Hemiptera), Arch. Inst. Biol., 6, 1935, pp. 141-154, 5 figs. — III. Concerning Brazilian Tingitidae (Hemiptera) Rev. Ent., 8, 1938, pp. 44-68, 11 figs.

Holotype (male), *allotype* (female) and 11 *paratypes,* taken on *Veronia polyanthes* (Spr.) Less. *(Compositae),* Campinas, São Paulo, May 13, 1937.

SUBFAMILY TINGITINAE

3. *Monanthia figurata* Drake

Marilia, São Paulo, 43 specimens, Jan. 9, 1937, collected on *Cordia* sp. *(Borraginaceae);* 4 specimens, Curvello, Minas Geraes, April 12, 1937.

4. *Teleonemia funerea* Costa

Chapada, Matto Grosso, H. H. Smith. These examples agree very well with Costa's colored figure of the type. The type of *funerea* is apparently lost and cannot be located in the Costa collection in Italy.

5. *Teleonemia validicornis* Stal

Santarem, Pará, Bello Horizonte, Minas Geraes and Bahia, many specimens.

6. *Teleonemia luctuosa* Stal

Rio de Janeiro, 1 example.

7. *Teleonemia forticornis* Champion

Bello Horizonte, Minas Geraes, 1936, Oscar Monte, collector. Other examples are at hand from Perú and Argentina.

8. *Teleonemia aterrima* Stal

Santarem, Pará, 4 examples.

9. *Teleonemia limbata* Stal

Chapada and Corumbá, Matto Grosso, numerous examples. Specimens are also at hand from Paraguay.

10. *Teleonemia lanceolata* (Walker)

(Plate 9, fig. B)

Campinas, São Paulo, 20 specimens, breeding on cultivated squash, *Cucurbita moschata* Duchesne, Feb. 12, 1937, B. L. Ribeiro, collector; 1 example, Viçosa, Minas Geraes, May 23, 1933. Widely distributed in Brazil.

11. *Teleonemia annae* (Kirkaldy)

Pará, 1 female. The type *(Americia annae* Kirk.) from Marcapata, Perú is in the Drake collection.

12. *Teleonemia triangularis* Blanchard

São Paulo and Bahia, 2 examples.

13. *Eurypharsa championi* Bergroth

Bahia, 3 examples; Rio de Janeiro, 1 example.

14. *Eurypharsa nobilis* Guerin

Villa Braga, Guaporé, Pará and Rio de Janeiro; also one example, Bonda, Colombia.

15. *Eurypharsa quadrifenestrata* Bergroth

(Plate 9, fig. C)

São Paulo, Capital, Dec., 1937, 2 specimens, J. Guerin, collector; Bahia, 2 examples. This is one of the very largest and most striking members of the family *Tingitidae* in the Western Hemisphere.

16. *Leptodictya ochropa* Stal

Viçosa, Minas Geraes, April 9, 1934, 2 examples, taken on bamboo *(Gramineae)*. Several other specimens are also at hand from Brazil.

17. *Leptodictya fuscocincta* Stal

Viçosa, Minas Geraes, March 18, 1934, 5 examples, taken on bamboo *(Gramineae)*.

18. *Leptodictya approximata* Stal

São Paulo, Jan. 12, 1928, I. Sande, collector, 1 example; one example, Blairmont, British Guiana, collected by H. F. Box.

19. *Leptodictya solita,* sp. nov.

(Plate 9, fig. D)

Similar to *L. sodalatis* Drake from Bolivia but separated from it by smaller size, lighter color, lack of prominent color markings, narrower costal area and each elytron more narrowed apically. Antennae testaceous, most of terminal segment dark, clothed with numerous, long, bristly hairs (*sodalatis* much more densely clothed with long hairs); segment I not very stout, about two and one half times as long as II; III nearly three times as long as IV, testaceous, the latter with apical half fuscous. Head convex above, shiny, armed with five extremely long, slender, sharp, testaceous spines.

Pronotum testaceous, the hood, carinae and paranota very similar to *sodalatis*. Elytra testaceous, with two or three of the transverse nervures embrowned, the outer margin beset with long, very slender spines (almost bristle-like); costal area rather widely reticulated, five to six areolae deep, the areolae much larger than in *sodalatis*; subcostal area uniseriate; discoidal area reaching beyond middle of elytra, with an oblique, embrowned nervure beyond middle. Legs

long, slender, testaceous, the tarsi dark. Bucculae testaceous, closed in front. Rostral laminae foliaceous, testaceous, open behind; rostrum extending to near apex of sulcus, the tip black.

Length, 3.85 mm.; width, 2.00 mm.

Holotype (female) and 4 *paratypes,* Ponte Nova, Minas Geraes, April 21, 1934, collected on *Olyra* sp. *(Gramineae).* This species is very different from *L. olyrae* DRAKE from Brazil.

20. *Leptodictya olyrae* DRAKE

Viçosa, Minas Geraes, May 13, 1934, on *Olyra* sp.

21. *Leptodictya comitis,* sp. nov.

(Plate 10, fig. E)

Closely allied to *L. paspalii* DRAKE and HAMBLETON but easily distinguished from it by more elevated and uniseriate carinae and the veinlets along the outer margin of costal area and distal half of elytra are smoky brown. Head strongly convex above, reddish brown, the hind pair and median spines very long, testaceous, with dark tips. Rostral channel narrow, open behind, the laminae testaceous. Rostrum yellowish brown, with apex black, extending to metasternum. Antennae moderately long, testaceous, most of terminal segment black; segment I slightly stouter and twice as long as II; III three times as long as IV.

Pronotum dark fuscous, moderately convex, deeply pitted, the lateral carinae parallel, the median slightly more elevated in front. Hood small, testaceous, faintly produced forward in front. Paranota testaceous, moderately broad, the turned over portion biseriate and with its outer margin resting on the upper surface of pronotum. Elytra a little narrower at base than in *L. paspalii,* the costal area a little narrower and mostly quadriseriate; quinqueseriate in widest part; discoidal area long, the nervelets infuscate; subcostal area very narrow uni- or biseriate.

Length, 3.75 mm.; width, 1.80 mm.

Holotype (male), *allotype* (female) and 30 *paratypes,* Ponte Nova, Minas Geraes, April 21, 1934, taken on bamboo, *Olyra* sp. *(Gramineae).* Separated from *L. olyrae* DRAKE by wider paranota, differently shaped hood, foliaceous carinae, narrower and more widely reticulated costal area.

22. *Leptobyrsa ardua* DRAKE

Campinas, São Paulo, May 25, 1937, seven examples taken on an undetermined species of *Compositae,* JOÃO DE OLIVEIRA, collector.

23. *Leptopharsa inflexa,* sp. nov.

(Fig. 1)

Size, color and general appearance very similar to *L. adversa* DRAKE and HAMBLETON but readily separated from it by the narrower basal half and more constricted elytra at middle; costal area without transverse bar at middle;

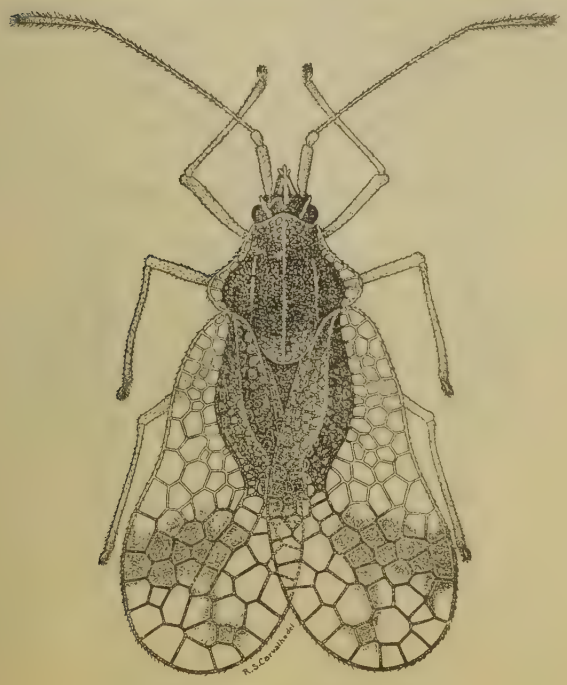


Fig. 1 — *Leptopharsa inflexa,* sp. nov.

collum fuscous; boundary between subcostal and sutural areas distinctly more elevated; and apical band much broader and very distinct. Rostrum dark brown, extending almost to end of sulcus. Bucculae contiguous in front. Other characters very similar to *L. adversa.*

Length, 2.90 mm.; width, 1.20 mm.

Holotype (male), *allotype* (female) and 5 *paratypes,* São Paulo, Capital, Sept. 9, 1934, collected on *Ocotea lanata* Mez. *(Lauraceae).*

24. *Leptopharsa miconiae,* sp. nov.

(Fig. 2)

Form and general aspect very similar to *L. cognata* Drake and Hambleton but separated from it by slightly larger size, longer antennae, slightly larger hood, large fuscous spot near apex of discoidal area, broader subcostal area, much wider discoidal area, and the strongly raised boundary between discoidal and subcostal areas. Antennal segment I longer and cephalad spines generally shorter than in *L. cognata.* Other characters very similar to *cognata.*

Length, 3.20 mm.; width, 1.20 mm.

Holotype (male), *allotype* (female) and 19 *paratypes,* Alto da Serra, São Paulo, June 3, 1935, taken on *Miconia* sp. *(Melastomaceae).*

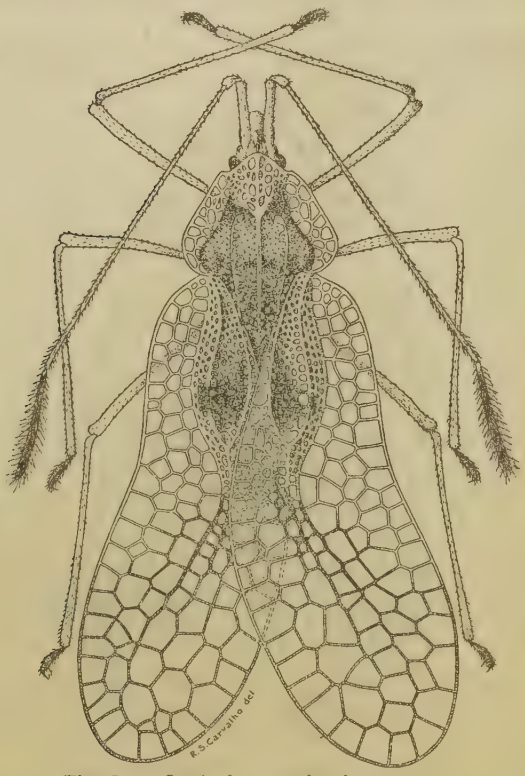


Fig. 2 — *Leptopharsa miconiae,* sp. nov.

25. *Leptopharsa difficilis,* sp. nov.

(Plate 10, fig. F)

Head convex above, brownish black, with three short, blunt spines. Bucculae yellowish brown, closed in front. Rostrum testaceous, black at tip, extending near base of mesosternum. Body beneath dark brown to almost black. Legs brown, the tibiae testaceous, the tarsi black. Eyes dark. Antennae moderately long; segment I stouter and less than a half longer than II, both black; III yellowish brown, straight, a little more than two and one half times as long as IV, the latter black.

Pronotum moderately convex above, closely pitted, tricarinate, brown to reddish brown, the apex of hind process, hood, collar and paranota mostly testaceous; carinae sharply raised, indistinctly areolate, the lateral pair parallel; paranota rather narrow, uniseriate behind, broader and biseriate in front; collar reticulate, with anterior margin testaceous; hood very small, faintly produced forward in front. Elytra a little longer than abdomen, when at rest strongly overlapping and jointly rounded behind, testaceous, the nervelets considerably variegated with dark brown to black fuscous; costal area uniseriate, the areolae moderately large, subcostal area broader, mostly triseriate; discoidal area more widely reticulated, the nervelets mostly dark fuscous.

Length, 2.22 mm.; width, 0.80 mm.

Holotype (male), *allotype* (female) and 7 *paratypes,* Campinas, São Paulo, Feb. 10, 1938, taken on *Chlorophora tinctoria* (L.) GAUD. *(Moraceae)*, B. L. RIBEIRO, collector. This species is very distinct and not easily confused with any known South American lace bug. The basal portion of hind process of pronotum is black and the calli are usually covered with exudation. The head, body beneath and pronotum are also often faintly covered with pale exudation.

26. *Gargaphia serjaniae,* sp. nov.

(Plate 10, fig. G)

Differs from *G. obliqua* STAL in having narrower and triseriate paranota, larger hood, shorter lateral carinae and costal area without oblique, fuscous nervures. Pronotum moderately convex, brown, the triangular process mostly testaceous and reticulate; paranota rather broad, widely reticulate, triseriate, testaceous, the outer margin broadly rounded; carinae foliaceous, testaceous, the median slightly more elevated and extending slightly under the hind portion of hood, the lateral carinae scarcely extending as far forward as the hind margin of hood; hood testaceous, compressed laterally, projecting forward in front, longer than high. Antennae slender; segment I brown, about two and one half times as long as II; III testaceous, about two and one half times as long as IV, the latter with apical three-fourths black. Head convex above, with five, slender, testaceous spines, the median and hind pair very long.

Elytra broad, with an oblique, dark-fuscous apical band; costal area very broad, four areolae deep in widest part, the areolae large and hyaline; subcostal area very broad, with a longitudinal, costate, pale fuscous nervure near the outer margin; discoidal area elongate, moderately impressed, bounded by prominent nervure.

Length, 3.40 mm.; width, 1.75 mm.

Holotype (male), *allotype* (female) and 5 *paratypes,* Pedro Leopoldo, Minas Geraes, Jan. 24, 1934; 8 *paratypes,* São Paulo, Capital, Sept. 9, 1934; 10 *paratypes,* Campinas, São Paulo, March 10, 1936, on *Serjania* spp. *(Sapindaceae)*; 1 *paratype,* Chapada, Matto Grosso.

27. *Dicysta smithi* DRAKE

Campinas, São Paulo, March 25, 1936, six examples; nine specimens, Mogy Mirim and Monte Mór, São Paulo, March and April, 1938. Known heretofore only from Chapada, Matto Grosso.

TINGITOIDEA DO BRASIL (HEMIPTERA) (PARTE IV)

Resumo

Este é o quarto duma série de trabalhos tratando da superfamilia *Tingitoidea* do Brasil. Estão incluidas notas sobre 27 especies, das quaes 7, provenientes dos Estados de Minas Geraes e São Paulo, são descritas como novas para a ciencia.

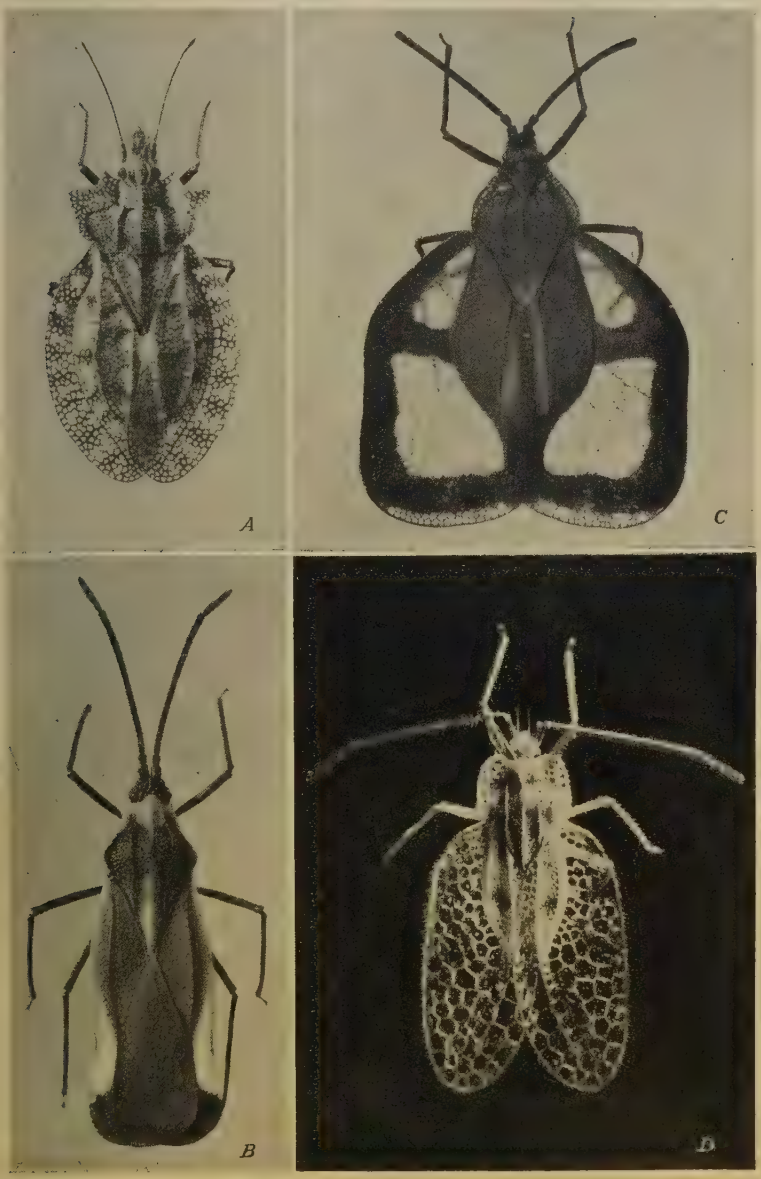


Fig. A. *Phatnoma veroniae*, sp. nov. — Fig. B. *Teleonemia lanceolata* (WALKER) — Fig. C. *Eurypharsa quadrifenestrata* BERGROTH — Fig. D. *Leptodictya solita*, sp. nov. (E. J. Hambleton, fot.)

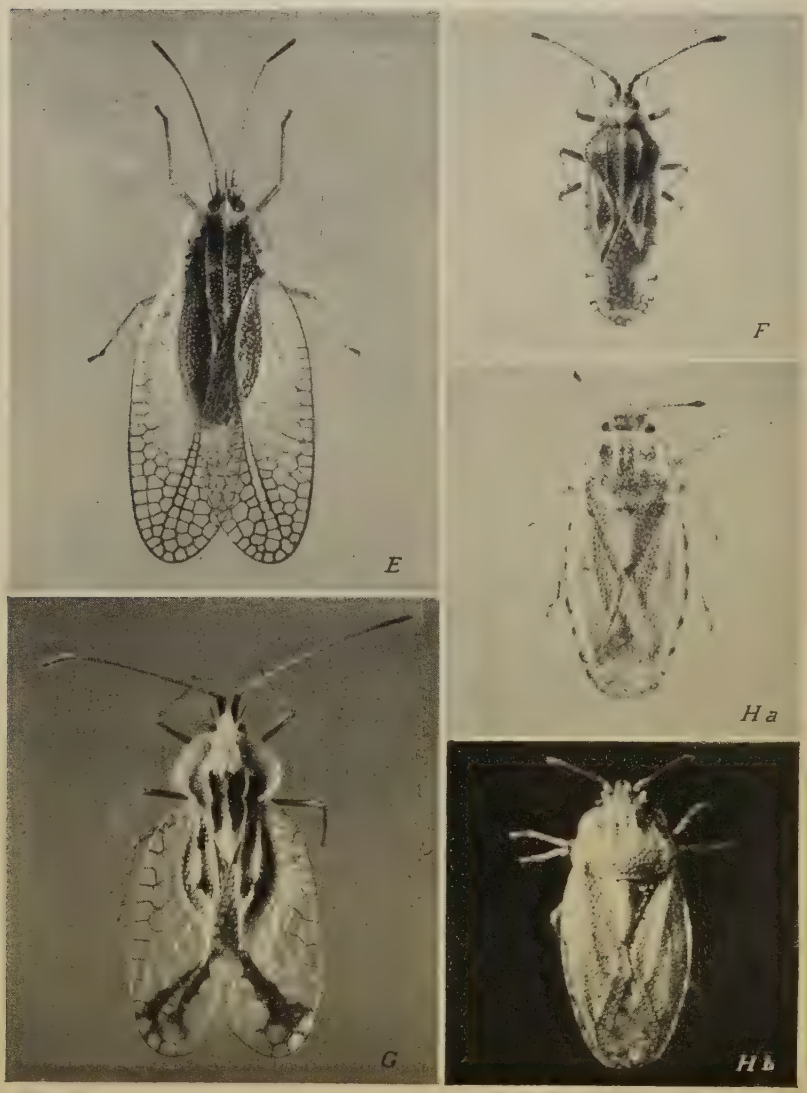


Fig. E. *Leptodictya comitis*, sp. nov. — Fig. F. *Leptopharsa difficilis*, sp. nov. — Fig. G. *Gargaphia serjaniae*, sp. nov. — Fig. H, a and b. *Piesma cinerea* SAY (E. J. Hambleton, fot.)

CONTRIBUIÇÃO PARA O CONHECIMENTO DOS "EUCHROMIIDAE"

III - GENERO "COSMOSOMA HÜBNER, 1827" (LEPIDOPTERA)

POR

L. Travassos Filho

Do Instituto Biologico de S. Paulo

Com 16 figuras no texto e estampa 11

Em continuação ao objetivo das notas anteriores, estudaremos neste trabalho, o genero *Cosmosoma* HÜBN., 1827, genero que compreende cerca de 150 especies, das quaes estudaremos apenas a especie tipo.

Cosmosona HÜBNER, 1827.

Syn.: *Cosmosoma* HÜBNER, 1827.
Cosmosoma HARRIS, 1839.
Lagaria WALKER, 1854, n. pr., p. 164 (nec DALLAS, 1852).
Erruca WALKER, 1854, p. 165.
Ilipa WALKER, 1854, p. 166.
Aristodaema WALLENGER, 1858.
Erruca BUTLER, 1876, p. 377.
Cosmosoma BUTLER, 1876, p. 386.
Cosmosoma MÖSCHLER, 1877, p. 635.
Glaucopis BURMEISTER, 1878, p. 371, 373.
Cosmosoma DRUCE, 1884, p. 58.
Rezia KIRBY, 1892.
Cosmosoma HAMPSON, 1898, p. 225.
Cosmosoma ZERNY, 1912, p. 67.
Cosmosoma DRAUDT, 1915, p. 71.

Para este genero, HAMPSON, 1898, dá a seguinte diagnose:

Proboscida bem desenvolvida; palpos voltados para cima, moderadamente escamosos e atingindo, em cima, o vertex da cabeça; antena bipectinada, com ramos relativamente curtos, dilatados nas extremidades. Tibias com espinhos curtos. Asa anterior alongada; 3.ª nervura antes do angulo da celula; 4.ª e 5.ª no angulo; 6.ª no angulo superior; 7.ª, 8.ª, 9.ª e 10.ª forquilhadas; 11.ª da celula. Asa posterior com 2.ª e 4.ª nervuras forquilhadas; 3.ª e 5.ª ausentes, ou 3.ª muito perto da margem; 6.ª e 7.ª no angulo superior.

Especie tipo *Cosmosoma auge* (L., 1767).

Cosmosoma auge (L., 1767).

Figuras 1-15 e estampa 11

Syn.: *Sphinx auge* L., 1767, p. 807.
Cosmosoma omphale HÜBNER, 1827, II, figs. 1, 4.
Cosmosoma omphale HARRIS, 1839, p. 317.

Cosmosoma omphale CLEM., 1860, p. 544.
Cosmosoma omphale STRETCH, 1872, p. 153.
Cosmosoma auge BUTLER, 1876, p. 388.
Cosmosoma melitta MÖSCHLER, 1877, p. 635, est. 8, fig. 3.
Cosmosoma auge MÖSCHLER, 1877, p. 635.
Glaucopis omphale BURMEISTER, 1878, p. 374.
Cosmosoma auge GUNDLACH, 1883, p. 239.
Glaucopis omphale DEWITZ, 1883, p. 251, est. I, fig. 4.
Sphinx auge DRUCE, 1884, p. 60.
Cosmosoma omphale SMITH, 1886, p. 181.
Cosmosoma melitta KIRBY, 1892.
Sphinx auge KIRBY, 1892.
Cosmosoma omphale MABILDE, 1896, p. 156, est. 15, fig. 2.
Sphinx auge HAMPSON, 1898, p. 227.
Cosmosoma auge SCHROTTKY, 1909, p. 124.
Cosmosoma auge ZERNY, 1912, p. 68.
Cosmosoma auge DRAUDT, 1915, p. 71, est. 13 C. (1)
Cosmosoma auge ZERNY, 1931, p. 235.
Cosmosoma auge COSTA LIMA, 1936, p. 250.
Cosmosoma auge HAGMANN, 1938, p. 190.

Côr geral: Torax vermelho e preto; abdomen vermelho-preto.

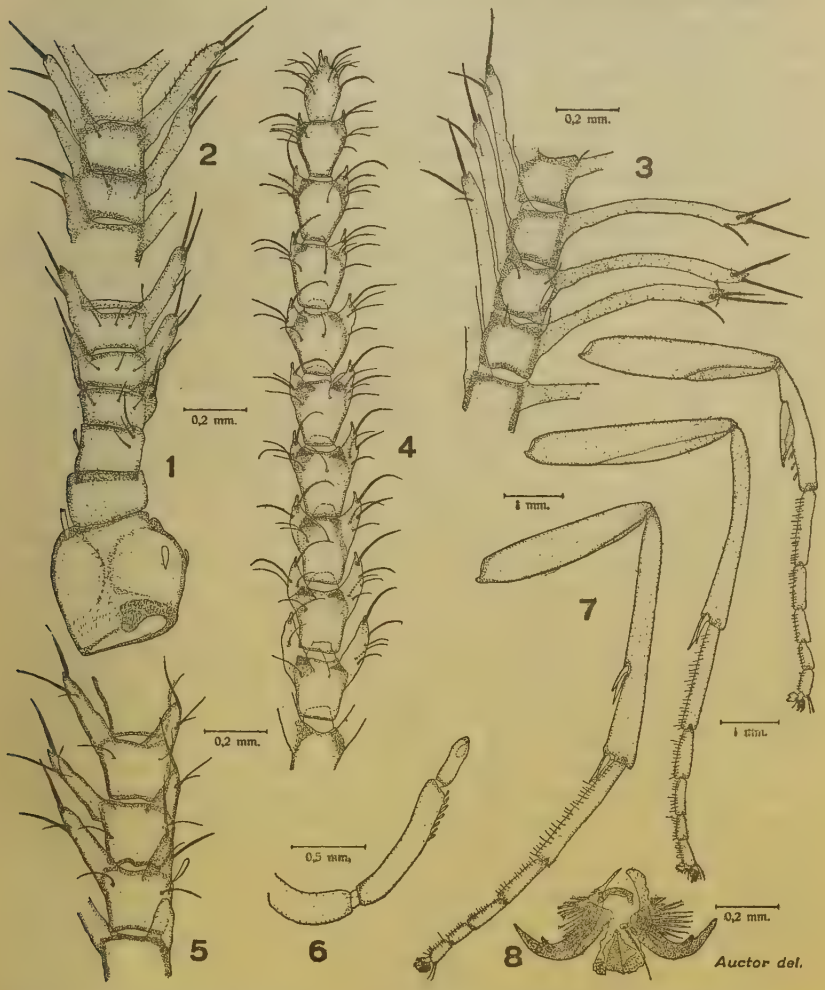
Macho: Comprimento total do corpo: 15,2 mm.. Cabeça: 1,5 mm.. Torax: 4,2 mm.. Abdomen: 9,5 mm.. Asa anterior: comprimento 16 mm. por 6 mm. de largura. Asa posterior: comprimento 9 mm. por 4 mm. de largura.

Femea: Comprimento total: 17 mm.. Cabeça: 1,5 mm.. Torax: 5 mm.. Abdomen: 10,5 mm.. Asa anterior: 19 mm. de comprimento por 8 mm. de largura. Asa posterior: 11 mm. de comprimento por 4,5 mm. de largura.

Descrição do macho (est. 11, fig. A): Cabeça: Fronte azul nos exemplares novos e parcialmente negra nos velhos por perda das escamas azues. Palpos inteiramente voltados para cima. Primeiro segmento palpal revestido de longas escamas vermelhas; segmento médio inteiramente preto; segmento terminal tambem totalmente preto, apresentando na extremidade apical uma escavação revestida internamente de escamas (fig. 6). Vertex azul brilhante com escamas negras. Gula preta. Antenas negras, com os 2 quintos apicais, brancos, medindo cerca de 13 mm. de comprimento e com cerca de 65 articulos. Cada articulo, a partir do 4.º basal, que tem apenas 1 apofise, tem 1 par de apofises ligeiramente claviformes, que atingem o maximo de comprimento do articulo 20 ao 30, diminuindo progressivamente até a extremidade. Os ultimos articulos têm as apofises reduzidas a elevações laterais anteriores, que terminam em ponta aguda. Cada processo apresenta uma pequena cerda terminal nos primeiros articulos, que tende a subterminal, deixando livre a extremidade do processo. Ha ainda duas outras cerdas proximas dessa primeira e que junto com ela permanecem em todos os articulos mais ou menos grupadas, formando um triangulo. Na base das apofises nota-se um par de pequenas cerdas. Medem as apofises maiores cerca de 0,60 mm. de comprimento. As escamas que revestem os articulos e apofises são lanceoladas e chanfradas na extremidade apical (figs. 1-4). Tromba pardo escura, bem desenvolvida.

(1) Para esta especie Draudt fez uma forma nova — *C. auge nicrothorax* (est. 13 B).

Torax: Tegula negra, com uma porção central recoberta de escamas azul-brilhante; nos exemplares novos, pode-se encontrar escamas azues tambem na periferia da tegula. Patagia vermelha na metade interna e preta na externa. Mesonoto vermelho, com larga faixa mediana preta, que na sua porção terminal

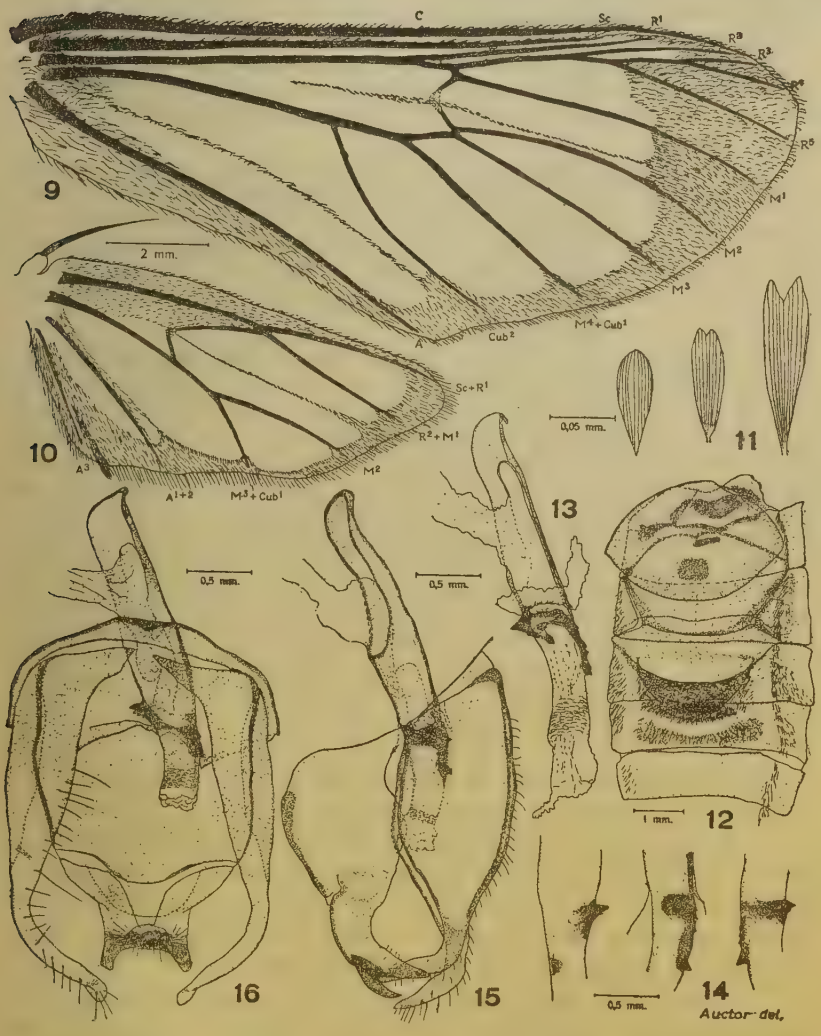


Cosmosoma auge (L., 1767). Fig. 1 — Segmentos basaes (1-6) da antena do macho. Fig. 2 — Segmentos basaes (7-10) da antena do macho. Fig. 3 — Segmentos medianos (21-25) da antena do macho. Fig. 4 — Segmentos terminaes (55-65) da antena do macho. Fig. 5 — Segmentos medianos (22-25) da antena da femea. Fig. 6 — Palpo do macho. Fig. 7 — Primeira, segunda e terceira pernas do macho. Fig. 8 — Terminação do tarso.

tem uma zona de escamas azul-brilhante, quasi formando um triangulo, cuja base estaria voltada para o abdomen. Pleuras vermelhas. Pernas tambem vermelhas, tendo os femures posteriores, as metades inferiores pretas. Na primeira perna a tibia é negra, com a face externa da extremidade distal vermelha, medindo cerca de 2 mm. de comprimento, e apresentando uma epifise, de cerca de 1,1 mm. de comprimento. Essa epifise é preta, com algumas escamas vermelhas na base. Tibia média com cerca de 3,5 mm. de comprimento, preta, com larga mancha vermelha na face externa da extremidade distal, apresentando um par de espinhos negros desiguais, medindo o maior cerca de 0,6 mm. de comprimento e o menor cerca de 0,5 mm.. Tibia posterior com a metade interna totalmente vermelha e outra metade preta, e medindo cerca de 4,5 mm. de comprimento, apresentando dois pares de espinhos; um primeiro par, apical, com espinhos medindo cerca de 0,4 mm. de comprimento, o menor, e 0,6 mm., o maior; o outro par fica situado cerca de 1,6 mm. acima do par apical, e os espinhos têm os mesmos comprimentos (fig. 7). Tarsos anteriores vermelhos; 1.º articulo dos tarsos medios e posteriores com a metade interna preta e a metade externa vermelha; outros articulos, vermelhos. Terminam os tarsos, por duas fortes garras, que apresentam, cada uma, um forte espinho no terço apical (fig. 8). Paronichio simples, flabeliforme. Asas (figs. 9-10 e estampa 11, figs. A, C) transparentes, com regular pubescencia, que se acentúa para as margens. As nervuras são revestidas por escamas pretas lanceoladas, ás vezes com apice truncado (fig. 11). As margens apresentam uma franja e uma larga faixa constituidas por escamas negras, sendo a faixa muito larga no apice da asa anterior, onde atinge cerca de 2,8 mm. de largura. As margens internas abaixo das nervuras A^s, além das escamas pretas, são revestidas de longos pêlos vermelho-claro. A nervura transversal é recoberta de escamas pretas, que formam uma faixa negra, mais larga na parte anterior. Partindo do meio das celulas e prolongando-se até as margens, temos pseudonervuras formadas por linhas de escamas. Acima das A^s temos outras pseudonervuras. Nervulação: Asa anterior: Sc terminando acima da origem de R^2. R^1 tem origem abaixo do angulo da celula. As outras R^s se reunem bem antes da celula, na seguinte ordem: R^3, R^4, R^5 e R^2. R^1, R^2 e R^3 terminam antes do apice da asa; R^4 no apice e R^5 depois do apice. M^1 tem origem no angulo anterior da celula. M^2 e M^3 no angulo posterior. $M^4 + Cub^1$ tem origem aproximadamente a 0,8 mm. abaixo do angulo posterior. Cub^2 a 2,3 mm. do angulo posterior da celula. A prolongando-se até o angulo posterior da asa. Nervura transversal muito delgada na sua parte mediana, formando um angulo bastante aberto, cujo vertice está voltado para dentro de celula. Asa posterior: $Sc + R^1$ e $R^2 + M^1$ partindo do angulo anterior da celula. M^2 tem origem no angulo posterior e $M^3 + Cub^1$ tem origem a cerca de 1,4 mm. acima do angulo posterior. $A^1 + 2$ e A^3 isoladas. Nervura transversal muito delgada na parte mediana, formando um angulo quasi recto, com abertura para fóra, com lados desiguais, sendo o lado anterior cerca de 3 vezes maior que o posterior. Frenulo côr castanho-clara, medindo cerca de 2,45 mm. de comprimento.

Abdomen: Dorsalmente: os quatro primeiros tergitos são vermelhos, apresentando manchas medianas negras, que formam uma faixa preta, que se alarga do primeiro ao quarto tergito. No 2.º, 3.º e 4.º tergito, a mancha negra apresenta na porção posterior numerosas escamas azul-brilhante, formando um triangulo, cuja base está na margem posterior do tergito e cujo vertice não toca a margem anterior. 5.º, 6.º, 7.º e 8.º tergitos negros, apresentando manchas

azul-brilhante laterais e dorsais, formadas por escamas azul-brilhante. A face ventral é totalmente preta, tendo apenas lateralmente ao nivel dos 2.º e 3.º tergitos, manchas brancas. Ainda na face ventral encontramos um orgão curioso, consti-



Cosmosoma auge (L., 1868). Fig. 9 — Asa anterior do macho. Fig. 10 — Asa posterior do macho. Fig. 11 — Escamas da asa anterior do macho. Fig. 12 — Face ventral dos primeiros segmentos do abdomen do macho. Fig. 13 — Falosoma desinvaginado. Fig. 14 — Varios aspectos da armadura do falosoma. Fig. 15 — Genitalia do macho, de perfil. Fig. 16 — Genitalia do macho, vista ventral.

tuido das seguintes partes: uma grande escama quitinosa originada no bordo anterior do 1.º esternito e que se estende para traz até cobrir quasi todo o 2.º esternito. No 2.º esternito elevam-se 2 saliencias laterais, que se ajustam á escama, formando uma cavidade. Finalmente, no terceiro esternito ha uma membrana bastante quitinisada, que forma uma bolsa, mediana, que termina na parte anterior do 4.º esternito. A cavidade assim formada é densamente cheia de longos e sedosos pêlos, de côr branca, dispostos irregularmente no interior. Para se ver a bolsa posterior é necessario retirar as escamas do esternito (fig. 12 e estampa 11, figs. C, D). Esse orgão foi bem observado nesta especie por SMITH, 1886.

As femeas (estampa 11, fig. B) são semelhantes aos machos, dos quaes se distinguem pelo menor desenvolvimento dos articulos das antenas, medindo os maiores cerca de 0,28 mm. de comprimento (fig. 5), asas relativamente mais largas, pela ausencia de manchas brancas laterais no abdomen, ao nivel do 2.º e 3.º esternitos, e finalmente por não terem na face ventral dos primeiros segmentos abdominais o aparelho descrito para os machos. Não ha aparelho odorifero, descrito em outros generos.

Genitalia: (Figs. 13-16) *Claspers* (figs. 15-16), bem desenvolvidos, sendo a porção terminal quasi cilindrica, recurvada para dentro e para cima, tendo as extremidades voltadas para traz. A parte interna da porção mais larga e a subcilindrica são revestidas de longas escamas pretas. Medem cerca de 2,8 mm. de comprimento. Não ha harpa. *Uncus* é simples e forte, constituido por um processo mediano unico, que na sua extremidade se divide em tres ramos, um mediano, mais desenvolvido e completamente voltado para baixo, e dois laterais, simetricos, bastante quitinisados, terminando por pontas agudas inclinadas para baixo e para traz. O ramo mediano é recoberto, lateralmente, por longas cerdas, que se prolongam por toda porção anterior do *uncus*. *Falosoma* (figs. 13, 14) claviforme, com curto funil membranoso, medindo cerca de 3,2 mm. de comprimento quando desinvaginado, e 2,6 mm. quando retraido. A porção erectil é inteiramente membranosa e delicada. Na parte anterior da porção não erectil ha uma zona cheia de elevações, com aspeto de escamas de peixe. Junto ao funil ha uma formação quitinosa, com grandes e pequenos espinhos, tomando diferentes aspetos nas varias posições (fig. 14).

HAMPSON, 1898, cita a seguinte distribuição geografica: Florida, Mexico, Jamaica, Surinam, Brasil (São Paulo) e Uruguai.

O novo material é constituido de numerosos exemplares provenientes do Estado do Rio de Janeiro (Angra, Jussaral e Manguinhos) e do Estado de São Paulo (Campos do Jordão — Eugenio Lefevre).

HAMPSON, 1898, dá descrição do ovo, larva, casulo e pupa; como alimento das larvas, refere a *Mikania scandens*.

COSTA LIMA, 1936, refere larvas desta especie alimentando-se com *Mikania scandens* (guaco) e *Lagenaria vulgaris*, no Estado do Rio Grande do Sul.

Podemos acrescentar á diagnose generica de HAMPSON as seguintes caracteristicas da genitalia:

Falosoma com porção erectil membranosa, delicada, e com uma armadura quitinosa provida de espinhos, situada proximo ao funil. *Uncus* simples. *Claspers* simples, não apresentando harpa.

Os exemplares estudados neste trabalho, acham-se na coleção do Prof. Lauro Travassos, sob os numeros 14.818 a 14.828.

CONTRIBUTION TO THE KNOWLEDGE OF THE "EUCHROMIIDAE"
III - Genus "Cosmosoma Hübner, 1827" (Lepidoptera).

Abstract

In continuation of the objective of the previous notes, in this paper is studied the type species of the genus Cosmosoma Hübner, *a genus that includes about 150 species.*

BIBLIOGRAFIA

Burmeister — 1878 — *Desc. Phys. Rep. Argent.*, **5**, 373.

Butler — 1876 — Notes on the Lepidoptera of the family Zygaeniidae, with descriptions of new genera and species. *Jour. Linn. Soc. Lond.*, Zool. **12**, 324-407, pl. 27, figs. 3-7.

Clemens, B. — 1860 — Contributions to American Lepidopteriology. *Proc. Acad. Sci. Philad.*, **7**, 522-547.

Dewitz — 1882 — Beschreibungen von Jugendstadien exotischer Lepidopteren. *Nova Acta Acad. Leop.-Carol.*, **44**, 251-254, pl. 8, figs. 1-4.

Draudt, M. — 1915 — in Seitz, *Die Gross-Schmetterlinge*, II, **6**, 33-230.

Druce — 1884 — *Biol. Centr.-Amer.*, Lep. Het., **1**, 58-60.

Gundlach (*) — 1886 — *Ent. Cub.*, 239.

Haase — 1893 — Untersuchungen über die Mimicry. *Bibl. Zool.*, **8**, 73-161, pls. 1-14.

Hagmann, G. — 1938 — Syntomideos (Amatideos = Euchromideos) do Estado do Pará. — *Livr. Jub. Prof.* Travassos, Rio de Janeiro, 185-194.

Hampson — 1898 — *Cat. Lep. Phal.*, **1**, 225-255.

Harris (*) — 1839 — *Am. Jour. Sc.*, **36**, 317.

Hübner — 1827 — *Samml. Exot. Schmett.*, (ed. facsim. Wytsman, 1904-1908), **3**, 119-122, pl. 369, figs. 1-4.

Kirby — 1892 — *Cat. Het.*, **1**, 117-150.

Lima, A. M. da Costa — 1936 — *Terceiro Catalogo dos insectos que vivem nas plantas do Brasil.* Rio de Janeiro, 460 pp.

Linnaeus — 1767 — *Syst. Nat.*, ed. 12, 796-808.

Mabilde — 1896 — *Guia pratica para os principiantes colleccionadores de insectos.* Porto Alegre, 238 pp.

Möschler, H. B. — 1877 — Beiträge zur Schmetterlings-Fauna von Surinam, II. *Verh. zool.-bot. Ges. Wien.* **27**, 632-662.

Schrottky — 1909 — Mimetische Lepidopteren, ein Beitrag zur Kenntnis der Syntomidae Paraguays. *Iris*, **22**, 122-132.

Smith, J. B. — 1886 — Cosmosoma omphale. *Ent. Am.*, **1**, 181-186, figs. 1-7.

(*) Não consultado.

Stretch (*) — 1872 — *Zyg. & Bomb. N. Am.*, 153, pl. 7, fig. 5.

Travassos, L. — 1938 — Contribuição ao conhecimento dos Euchromiidae — I. Genero Desmotricha Hampson, 1911. *Memorias do Inst. Oswaldo Cruz,* Rio de Janeiro, **33**, 39-48.

Travassos Filho, L. — 1938 — Contribuição ao conhecimento dos Euchromiidae — II. Genero Corematura Butler, 1876. *Memorias do Inst. Oswaldo Cruz,* Rio de Janeiro, **33**.

Walenger (*) — 1858 — *Ofers. Svenska Akad. Förh.*, **15**, 163.

Walker — 1854 — *List Lep. Inst. Br. Mus.*, **1**, 1-278.

Zerny — 1912 — *Lepidopterum Catalogus,* **7**, 67-75.

Zerny — 1931 — Ergebnisse einer zoologischen Sammelreise nach Brasilien, insbesondere in das Amazonasgebiet. *Ann. Naturhist. Mus. Wien.*, **45**, 225-263.

EXPLICAÇÃO DA ESTAMPA 11

Cosmosoma auge (L., 1767)

Fig. A — Face dorsal do macho. Exemplar 14.820.

Fig. B — Face dorsal da femea. Exemplar 14.818.

Fig. C — Face ventral do macho; ve-se pela retirada da grande escama, o orgão abdominal repleto de pêlos brancos. Exemplar 14.819.

Fig. D — Perfil do macho; pêlos do orgão abdominal, escapando-se pela abertura da grande escama; notar a mancha branca do abdomen caracteristica do macho. Exemplar 14.822.
(Camargo fot.).

B
JUSSARAL
♀
B
A
1 cm.
C

SUPRARRENAES, PARATIROIDES E EQUILIBRIO MINERAL

POR

D. M. Cardoso

Do Instituto Biologico de S. Paulo

Com os trabalhos de SWINGLE, PFIFFNER, HARTMAN e outros, que conseguiram obter preparações contendo o hormonio da cortex suprarrenal, a cortina, foi possivel analisar melhor o quadro de insuficiencia suprarrenal, separando os sintomas devidos a estes dos causados por fatores estranhos.

Os sintomas mais importantes dos animais adrenalectomizados são: anorexia, profunda astenia, resistencia diminuida a variações termicas, baixa de temperatura do corpo e morte. Identico quadro se encontra nos individuos com molestia de Addison, que apresentam ainda certas peculiaridades: pigmentação, dôres, etc.

Entretanto as modificações observadas no sangue constituem os caracteres mais interessantes da falta de suprarrenaes.

São as seguintes: 1.º) elevação de teor em colesterina, 2.º) elevação do nitrogenio não proteico, 3.º) deshidratação e aumento da viscosidade, 4.º) baixa do sodio e cloro, 5.º) elevação do potassio e 6.º) acidose.

A elevação do N não proteico foi proposta como test para estandartizar a cortina, tal a precocidade com que se apresenta após a adrenalectomia, como mostraram MARSHALL e DAVIS. (7) A deshidratação do sangue é devida a uma perda de agua do plasma para os tecidos onde ela é retida dentro das células.

As modificações do sodio, potassio e do cloro são as mais importantes de todas, porquanto parecem ser a causa de todas as outras manifestações.

A constatação da balança negativa do sodio e do cloro devido a uma maior eliminação desses elementos em relação a absorção, foi feita por LOEB (6) e HARROP (3) e deu origem á descoberta sensacional, feita por LOEB, de que o cloreto de sodio, até certo ponto, pode evitar as consequencias da falta de cortina.

Os resultados obtidos por LOEB, HARROP e colaboradores foram confirmados por grande numero de autores, especialmente por KENDALL e ALLERS (5), que conseguiram manter cães adrenalectomizados durante mezes, sem cortina, apenas recebendo uma mistura salina rica em sodio e pobre em potassio.

Desses trabalhos resulta a impressão de que a relação Na/K talvez seja a chave de todas as manifestações da falta de hormonio da cortex suprarrenal.

O fáto de que a cortina regula a relação Na/K chamou imediatamente a atenção para a possivel ligação com o metabolismo de outros sais, especialmente com o do calcio, cujas relações com o Na e K são conhecidas.

Ora, exatamente esse elemento é controlado pelas paratiroides.

No livro de GROLLMAN «*The Adrenals*», publicado em 1936, encontra-se uma exposição detalhada de todas as relações entre as suprarrenaes e as outras glandulas; e a respeito das paratiroides, diz ele: «devemos concluir que não ha evidencia alguma de qualquer relação adreno-paratiroidiana».

Entretanto ha um trabalho de COLLIP, CLARK e SCOTT (1) em que são descritos os sintomas apresentados por cães injetados com grandes doses de paratormon; são: anorexia, astenia acentuada e morte; no sangue: espessamento e aumento da viscosidade, elevação do N não proteico (uréa), baixa do Na e Cl, elevação do Ca e acidose.

Evidentemente esses caracteres do quadro obtido graças ao excesso de hormonio da paratiroide são identicos aos observados nos animais adrenalectomizados.

Baseados nesse trabalho de COLLIP e colaboradores e na estreita relação entre os metabolismos do Na, K, e Ca, acreditamos na possibilidade de uma relação entre as glandulas que controlam esses elementos, isto é, entre as suprarrenaes e paratiroides.

No presente trabalho foram feitas experiencias de diversos tipos com o fim de verificar a relação de varios elementos: sodio, potassio e calcio, com o papel das suprarrenaes, das paratiroides e a possivel ligação entre ambas.

TÉCNICA: Todas as experiencias foram feitas em ratos de ambos os sexos, provenientes da mesma criação. As rações, diferentes, segundo as experiencias, foram as seguintes:

1) dieta comum: fubá, triguilho e trigo, em partes iguais.

2) Moóca 2:

Caseina purificada	20
Amido de arroz	55
Oleo de amendoin	12
Levedura sêca	8
Mistura salina	5
	100

Como essa é uma ração livre de vitamina A, era dada uma quantidade de vitamina suficiente para evitar o aparecimento da avitaminose.

Usamos essa ração para podermos ter uma idéa exata das quantidades de sais que o animal estava recebendo, porquanto a unica fonte era a mistura salina de OSBORNE e MENDEL.

A bebida foi agua ou soluções isotonicas dos diferentes sais, segundo o tipo da experiencia.

As operações, extirpações das suprarrenaes e paratiroides isoladas ou simultaneas, foram feitas com asepsia relativa. A adrenalectomia foi feita por duas aberturas laterais; além das glandulas foi removido todo o tecido gorduroso que as circumda, sendo tomado todo cuidado para que as glandulas saíssem intactas. Relativamente á paratiroidectomia, um unico corte é suficiente, e para que fosse total, foi extirpada tambem uma parte da tiroide; deve-se tomar cuidado com os vasos que passam pela região. Detalhes sobre a paratiroidectomia e suas particularidades no rato, podem ser encontrados no trabalho de SHELLING (9) e no artigo de THOMSON e COLLIP (11).

RESULTADOS

A. ADRENALECTOMIA. Na Tabela n.º 1, encontram-se os pesos e sobrevida relativos á adrenalectomia simples; sobrevida média de 7 dias, com cerca de 17,% de perda de peso. Os ratos nrs. 25, 34, 19

TABELA 1

Ratos

Dias	34	25	19	34B	3	24	21	8
1	214	216	89	78,5	114	93	90	45
2				71	109	87		42
3			75		104	80	89	41
4					100	78	85	41
5			70	66	98	†		†
6			†	†	92 †		85	
7							84	
8							83	
9	†	†					78 †	

Peso dado em gramas; † morte.

e 8 comiam a ração comum; os de nrs. 34-B, 3, 24 e 21 comiam Moóca 2, não havendo diferença sensivel no comportamento dos dois grupos.

B. ADRENALECTOMIA E SAIS. Nestas experiencias os ratos tinham, como unica fonte de liquido, soluções isotonicas dos diferentes sais; eles se adaptam rapidamente ás novas bebidas e bebem as soluções como se fossem agua.

1) Cl Na a 0,9 % — Tabela n.º 2. Sobrevida média — 14 dias; perda de peso 5,5 %. A ação do cloreto de sodio é muito nitida porquanto dobra a sobrevida, diminuindo muito a perda de peso.

TABELA 2

Dias	Ratos					
	17	7	13	8	19	8
1	112	81	105	100	97	121
2						
3						
4						
5					83,5	
6					†	
7						
8						
9						
10						
11						
12				92		
13				†		99,5
14		90				†
15		†	88			
16			†			
17	120					
18	†					

Pesos em gramas; † morte.

2) Ringer Mg — Resultados ainda melhores foram obtidos dando como bebida um Ringer em que se substitue o K pelo Mg, com a seguinte composição:

Cl Na	0,675 %
Ca Cl^2	0,020 %
Mg Cl^2	0,015 %
Na HCO^3	0,020 %

A sobrevida foi de 21 e 28 dias e o peso dos ratos praticamente não sofreu alterações. Se considerarmos que as rações usadas, espe-

cialmente a Moóca 2, são relativamente ricas em potassio, estes resultados são notaveis e levam a crer que, diminuindo o teor de potassio da alimentação e talvez do calcio, seja possivel manter ratos adrenalectomizados em vida, indefinidamente, apenas com o uso de maior quantidade de sodio, como obteve KENDALL com cães.

3) $CaCl^2$ — Tabela n.º 3. Os ratos adrenalectomizados suportam muito mal o calcio; a média de sobrevida é de 4 dias apenas, com uma perda de peso de 10 %.

Esta má tolerancia ao calcio na ausencia das suprarrenaes é um indicio seguro de uma ligação entre os mecanismos de regulação do sodio, potassio e calcio.

TABELA 3

Ratos

Dias	38	34	28	24	16
1	94	73	108	65,5	47
2			102		
3	81		†		41 †
4	†			56 †	
5					
6		66 †			

† morte

C. PARATIROIDECTOMIA. Com rações relativamente ricas em calcio como as usadas nestas experiencias, raramente se observam os fenomenos agudos da falta de paratiroides, como a tetania, e nunca a morte.

Entretanto não é possivel afirmar que não houve tetania, porquanto para isso seria necessaria uma vigilancia continua; só observamos a tetania violenta e espontanea em um rato que após a paratiroidectomia passou a beber Na Cl a 0,9 %. Esta verificação confirma os resultados de GREENWALD (2) que obteve tetania e convulsões em animais injetados com diversos sais de sodio, atribuindo os fenomenos a uma predominancia do sodio sobre o calcio do sangue, em consequencia da administração do primeiro.

D. ADRENALECTOMIA + PARATIROIDECTOMIA. Os animais suportam perfeitamente as operações apezar de serem mais demoradas e trabalhosas que as extirpações simples.

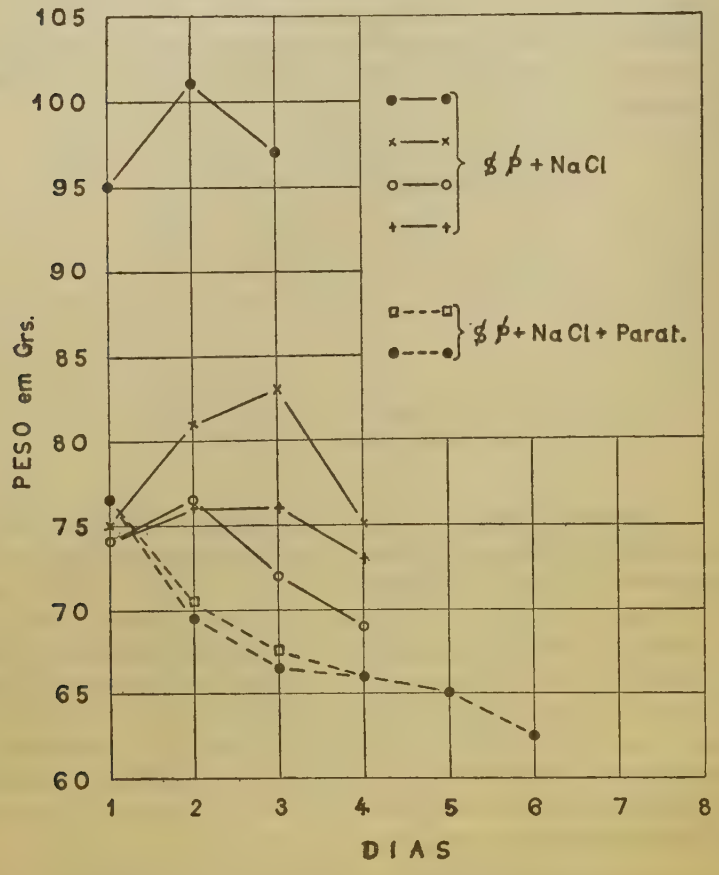
A sobrevida é praticamente identica á observada nos animais apenas adrenalectomizados, isto é: média 6,5 dias. Em um dos operados foi observada uma elevação de peso 3 e 4 dias após a operação. Esse aumento de peso traduz uma certa retensão de H^2O, porquanto

os animais pouco comem; entretanto não foi observada essa elevação na maioria dos animais.

E. ADRENALECTOMIA + PARATIROIDECTOMIA + SAIS. Bebida: soluções isotonicas.

1) Adrenalectomia + Paratiroidectomia + Cl Na

GRAFICO 1



No grafico estão os pesos dos animais desta série; a sobrevida apresenta-se ligeiramente reduzida, com uma média de 5 dias. O caracteristico essencial destes animais é a sua variação de peso; diversamente do que acontece em todos animais operados, estes não perdem peso, ao contrario, apresentam sensiveis elevações, como se verifica facilmente

no grafico. Esta elevação de peso é devida exclusivamente á retenção de agua pelos animais, porquanto a quantidade de alimento ingerida é duas a trez vezes menor do que a de ratos normais.

Aliás, a retenção de H^2O é facilmente verificada pelo apparecimento de edema nesses ratos.

2) Adrenalectomia + Paratiroidectomia + Cl Na + Paratormon. No mesmo grafico encontram-se ainda os pesos de ratos de que foram extirpadas as suprarrenaes e paratiroides e que foram injetados com 10 e 20 unidades de paratormon, (Lily), logo após a operação, e que recebiam Cl Na como bebida.

Estes ratos se comportaram como os Adrenalectomia + Paratiroidectomia + Agua como bebida, isto é, não apresentaram a elevação de peso nem o edema tipico nos animais da série anterior.

Portanto o paratormon impede a retenção de agua nesses animais, apezar de estarem bebendo Cl Na.

DISCUSSÃO

O mecanismo de ação da cortina ainda não está bem estabelecido.

Swingle e seus colaboradores, (10), em vista dos resultados obtidos em suas experiencias, acham que a cortina regula a distribuição interna da agua, isto é, o equilibrio entre a agua do sangue, dos espaços intercelulares e das células. Admitem que na falta de cortina ha deslocamento de H^2O do Na e do Cl para dentro das células, dahi o espessamento do sangue, baixa da pressão arterial e baixa daqueles elementos no sangue; acham que a perda de Na e Cl pelos rins, observada na adrenalectomia, não é essencial e que os rins não são influenciados pela cortina. Tambem não consideram essencial a elevação do K no sangue. Entretanto verificaram que os animais adrenalectomizados apresentam uma balança negativa de Na e Cl e retenção de K; além disso, quando dão a cortina, ha retenção de Na e Cl e maior eliminação de K. Quanto á significação do K, esses autores não parecem estar com a razão, conforme mostraram Kendall e Allers e especialmente Nilson (8); estes confirmaram plenamente a sugestão de Hastings e Compere (4), de que a elevação do K no sangue e a sua retenção são essenciais para o aparecimento dos fenomenos de insuficiencia suprarrenal, e Nilson aventa a hipotese de que a cortina regula a permeabilidade das células para o meio extra-celular e sangue; quando falta a cortina o K sáe em maiores quantidades e então aparecem os fenomenos tipicos da adrenalectomia. Apezar disso esses autores afirmam que a taxa de K no sangue nem sempre indica o gráo de insuficiencia.

Entretanto todos os pesquizadores são concordes em admitir que a cortina tem um papel decisivo no metabolismo desses elementos, Cl, Na, K e da agua e que esse controle é feito nos proprios tecidos, tendo sido eliminada a possibilidade de uma ação direta sobre os rins. Naturalmente, admitem que através das modificações no metabolismo salino, os rins tambem sejam afetados.

Não ha referencia quanto á relação que possa haver entre as modificações acima citadas e o metabolismo do calcio, nem com o papel das paratiroides.

Das nossas experiencias, evidencia-se que o Na realmente tem uma ação benefica sobre os ratos adrenalectomizados, aumentando muito a sua sobrevida.

Resultados muito melhores são obtidos com o emprego do Ringer sem potassio e com magnesio; póde-se admitir a sobrevida dos ratos adrenalectomizados e bebendo esse Ringer, como indefinida. Entretanto de todas as experiencias de adrenalectomia simples, os resultados mais interessantes são os obtidos com o calcio; evidencia-se a pessima tolerancia desses ratos ao calcio, constatando-se uma sobrevida muito menor.

Não se pode deixar de admitir uma relação estreita entre os metabolismos dos elementos controlados pela suprarrenal: cloro, sodio, potassio, e o do calcio, pois este tem ação tão pronunciada sobre os animais adrenalectomizados.

Se os metabolismos desses elementos estão tão ligados, é forçoso admitir uma relação entre as glandulas que os regulam, isto é, entre as suprarrenaes e paratiroides. Nas experiencias de adrenalectomia e paratiroidectomia verificamos o aparecimento de edemas, sob a ação do cloreto de sodio; evidentemente esse edema traduz uma grande retenção de agua, aliás evidenciada pelo aumento de peso dos animais. Ora, nenhum desses fatos é verificado quando as paratiroides estão presentes; além disso, a administração do paratormon inhibe essa retensão de agua e o aparecimento do edema.

Esses fatos evidenciam, novamente, correlação das suprarrenaes e paratiroides na regulação do metabolismo mineral dos animais, tanto que o afastamento de ambas acarreta perturbações nitidas que se traduzem pela retensão de agua, quando sob a ação do cloreto de sodio. Em vista desses fatos não se pode deixar de assinalar a semelhança entre o que se observa nos animais sem suprarrenaes e paratiroides e nos individuos com molestias renaes em que o cloreto de sodio tambem acarreta grande retensão de agua. Alias existem alguns trabalhos que demonstram a ação direta ou indireta do paratormon sobre

os rins; grandes doses paralisam quasi completamente o funcionamento renal em animais normais, ao passo que doses normais atúam como diureticos. Egualmente, têm-se obtido bons resultados em casos de nefrose, com o desaparecimento dos edemas.

ADRENALS, PARATHYROIDS AND MINERAL METABOLISM.

Abstract

Several experiences were made in rats to ascertain the role of the adrenals and parathyroids in the mineral control and to verify the possible relations between these glands.

The conclusions are:

1. The average survival of the adrenalectomized rats is 7 days, when they are fed a commom diet and drinking water.

2. Isotonic solution of sodium chloride given instead of water to adrenalectomized rats, prolongs the average survival to 14 days.

3. The survival of the adrenalectomized rats drinking a Ringer solution in which the potassium has been substituted by magnesium, is still greater: 21 to 28 days.

4. Adrenalectomized rats show a bad tolerance to calcium, since isotonic solution of calcium-chloride, given as a drink, reduces the average survival to 4 days.

5. Adrenalectomized and parathyroidectomized rats show a survival of 6,5 days, without any typical occurrence.

6. Adrenalectomized and parathyroidectomized rats, drinking an isotonic solution of sodium chloride, show a distinctive rise of the weight in the 3 initial days (graphic n.º 1).

This weight rise is a consequence of water retention and is paralleled with edema appearance.

7. Parathormon given to adrenalectomized and parathyroidectomized rats, drinking isotonic sodium chloride, checks the water retention and the appearence of edema.

8. All these results point to a close relation between the metabolism of sodium, potassium, chloride, and water with the calcium and between the glands that control them, the adrenals and parathyroids.

BIBLIOGRAFIA

1 — Collip, J. B., Clark, E. P. e Scott, J. W. — 1925 — The effect of a parathyroid hormone on normal animals. *Jour. Biol. Chem.*, **63**, 439-460.

2 — Greenwald, I. — 1922 — The supposed relation between alkalosis and tetany. *Jour. Biol. Chem.*, **54**, 285-303.

3 — Harrop, G. A., Soffer, L. J., Nicholson, N. M. e Strauss, M. — 1935 — *Exp. Med.*, **61**, 839.

4 — Hastings, A. B. e Compere, E. L. — 1930 — *Proc. Soc. Exp. Biol. and Med.*, **28**, 376.

5 — Kendall, E. C. e Allers, W. D. — 1937 — Maintenance of adrenalectomized dogs without cortin, through control of the mineral constituents of the diet. *Amer. J. Phys.*, **118**, 87-94.

6 — Loeb, R. F. — 1935 — J. A. M. A., **104**, 2177.

7 — Marshall, E. K. e Davis, D. M. — 1916 — *J. Pharm. Exp. Ther.*, **8**, 525.

8 — Nilson, H. W. — 1937 — Cortico adrenal insufficiency: metabolism studies of potassium, sodium chloride. *Amer. J. Phys.*, **118**, 620-631.

9 — Shelling, D. H. — 1932 — Calcium and phosphorus studies. 1. The effect of calcium and phosphorus of the diet an tetany, serum calcium, and food intake of parathyroidectomized rats. *Jour. Biol. Chem.*, **96**, 195-214.

10 — Swingle, W. W., Parkins, W. M., Taylor, A. R. e Hays, H. W. — 1937 — The influence of adrenal cortical hormone upon eletrolyte and fluid distribution in adrenalectomized dogs maintained on a sodium and chloride free diet. *Amer. J. Phys.*, **119**, 684-691.

11 — Thomson, D. L. e Collip, J. B. — 1932 — The parathyroid glands. *Physiol. Rev.*, **12**, 309-356.

VACINAÇÃO CONTRA CÓLERA AVIARIA COM AMOSTRA VIVA (TIPO AZUL) DE "PASTEURELLA AVICIDA"

POR

P. Nobrega e J. Reis

Do Instituto Biologico de S. Paulo

A ineficacia das vacinas mortas na profilaxia da cólera aviaria tem sido objeto de numerosas verificações no laboratorio e no campo. Em seus trabalhos classicos, já PASTEUR assinala o fato e refere a possibilidade de obter-se imunidade pela inoculação de culturas espontaneamente atenuadas. Não é facil, porém, conseguir os resultados de PASTEUR quando se procura repetir o metodo de atenuação de que êle se valeu, sendo licito pensar que o fenomeno de atenuação dependesse largamente de qualquer fator ligado á amostra usada.

Estudando de maneira sistematica a ação protetora de vacinas feitas com germes vivos de virulencia naturalmente baixa, ou experimentalmente atenuada, conseguimos obter uma amostra de *Pasteurella avicida* dotada de alto poder vacinante, a qual representa variante azul de uma amostra de tipo fluorescente.

MANEIRA DE OBTER A VACINA E SUAS CARACTERISTICAS

A dissociação da amostra fluorescente produz-se após passagens sucessivas em caldo simples adicionado de 0.25 % de cloreto de litio, substancia já reconhecida como elemento favorecedor da dissociação de certos cogumelos (1). Ao fim de vinte passagens diarias da amostra fluorescente nesse meio já se obtém grande proporção de colonias do tipo azul, o que se verifica por semeadura em placa de agar sangue hemolisado. As culturas obtidas a partir das colonias apresentam todos os caracteres culturais e bioquimicos de *P. avicida* e tambem os caracteres peculiares ás amostras do tipo azul assinalados por HUGHES e cols.: colonias pequenas, azuladas, semitransparentes, não confluentes e não fluorescentes; zona extensa de aglutinação acida (pH 2.4-5.0); aglutinação até o titulo por antisôros preparados em coelhos com culturas mortas de tipo fluorescente ou azul; poder patogenico para galinhas nulo, quando inoculada por via nasal, e muito fraco quando por via intramuscular: assim, doses de 0.5 cc. de cultura de 24 hs. em caldo, apenas provocam ligeira reação, que desaparece em 1-2 dias, ao passo que doses maiores (1 cc., por exemplo) determinam morte do animal em 2-5 dias. Nas mesmas condições

os pombos revelam-se muito mais sensiveis, sucumbindo em 20-24 hs. após a inoculação intramuscular de 0.1 cc. de cultura.

Nas experiencias que vamos referir a vacina consistiu sempre em cultura de 24 hs. e incubada a 37° de uma amostra obtida por dissociação em caldo cloreto de litio, da maneira acima explicada. Esta amostra será designada por *109 T.* A inoculação da vacina é feita na dose de 0.3 cc., no musculo peitoral. Para provar a imunidade usamos uma cultura de tipo fluorescente, altamente virulenta, que será designada por *P. 109.*

VACINAÇÃO COM UMA SÓ DOSE

Quarenta e cinco galinhas adultas recebem uma dose unica de vacina e 23 dias depois são inoculadas por via intramuscular com 0.1 cc. (cerca de 1.000 D. M. M.) de cultura em caldo, de 24 hs., de *P. 109.* Dezoito galinhas testemunhas, não vacinadas, recebem igual dose de *P. 109.*

Resultado: morrem todas as tertemunhas e das vacinadas sobrevivem 23.

VACINAÇÃO COM DUAS DOSES

Numa primeira experiencia feita com duas doses de vacina, intervaladas de 4 dias, e prova da imunidade (inoculação de *P. 109)* seis dias após a ultima dose de vacina, não melhorou a porcentagem de sobreviventes: de 5 galinhas vacinadas morreram 3; todas as testemunhas, em numero de 3, sucumbiram.

Aumentando, porém, o intervalo entre a primeira dose de vacina e a inoculação de prova com amostra virulenta, os resultados passam a ser excelentes: 16 galinhas recebem duas doses de vacina, intervaladas de 8 dias; 15 dias após a ultima dose, recebem 0.1 cc. de cultura de *P. 109.* Seis testemunhas recebem dose igual de *P. 109.* Todas as vacinadas sobrevivem, ao passo que sucumbem todas as testemunhas.

As experiencias acima referidas estão resumidas na tabela 1.

TABELA 1

Ação vacinante da amostra *109 T.*

Numero de galinhas	Vacina *109T* n.º de doses	Intervalo entre a ultima dose de vacina e a inoc. de prova, em dias	N.º de galinhas mortas	N.º de galinhas sobreviventes
45	1	23	22	23
5	2 (4)	6	3	2
16	2 (8)	15	0	16
27	0	—	27	0

Notas — O numero entre parentesis indica o intervalo entre as 2 doses de vacina. A inoculação de prova consistiu em cerca de 1000 d.m.m. de *P. avicida* tipo fluorescente (amostra *P 109).*

As pesquisas de aglutininas para a amostra *109 T* no soro das aves vacinadas deu os resultados resumidos na tabela 2.

TABELA 2

Aglutinação da amostra *109T* pelo soro de aves vacinadas

Diluição do soro	Dias após a 1.a dose		
	7	14	23
1:20	0	0	2
1:50	0	0	2
1:100	0	0	12

Nota — Os soros das galinhas normais usadas como testemunhas não aglutinam a amostra *109 T*.

RESISTENCIA DOS ANIMAIS VACINADOS Á INFECÇÃO NATURAL

Dez galinhas vacinadas com duas doses de vacina intervaladas de 8 dias são colocadas, 15 dias após a ultima dose, num cercado em que já se encontram 10 galinhas portadoras de cólera. No mesmo cercado são colocadas tambem 10 galinhas normais, livres de infecção (testemunhas).

O resultado desta experiencia está resumida na tabela 3.

TABELA 3

Resistencia dos animais vacinados á infecção natural por contato

	N.º de galinhas	Total de mortes
gal. test. . .	10	8
gal. port. . .	10	5
gal. vacin. .	10	2

Das galinhas testemunhas, tres morreram no 5.º dia após o inicio da experiencia, 4 no 11.º e 1 no 20.º. Das vacinadas, uma morreu no 20.º e outra no 23.º.

A pesquisa de aglutininas no soro das galinhas vacinadas, feita 12 dias após inoculação da 2.ª dose deu o resultado resumido na tabela 4.

TABELA 4
Teor de aglutininas dos soros de aves vacinadas

N.º de gals.	Titulo da aglutinação	
	1:20	1:50
3	+	—
2	+	±
5	+	+

TENTATIVA DE VACINAÇÃO COM DOSES MUITO PEQUENAS DE VACINA

Dez galinhas recebem duas doses de 0.3 cc. de uma diluição a 1 por mil de cultura em caldo de 24 hs. de *109 T,* diluição essa correspondente a muito poucos germens, conforme se póde vêr por semeadura em placa (raras colonias). Vinte e tres dias após a 1.ª inoculação, recebem 0.1 cc. de *P 109*, dose que tambem é injetada em 3 testemunhas.

Resultado: nenhuma das galinhas sobrevive. A pesquisa de aglutininas no sôro de todas as aves foi negativa.

VACINAÇÃO POR VIA NASAL

Cinco galinhas recebem duas doses de vacina *109 T* por via nasal, 1 cc. de cada vez, com intervalo de 8 dias, e 23 dias após são inoculadas com 0.1 cc. de P 109. Todas sucumbem.

COMPARAÇÃO DO PODER VACINANTE DA VACINA *109 T* COM O DE OUTRAS VACINAS E BACTERINAS

A tabela 5 mostra o resultado do estudo comparativo de diversas vacinas. Em todos os casos a inoculação de prova (amostra *P 109)* foi feita 21 dias após a primeira dose de vacina.

As vacinas mortas foram obtidas de culturas de 24 horas em agar sangue hemolisado, suspensas em agua fisiologica e ajustadas ao tubo 3 do nefelometro de McFarland. A vacina com a lanolina foi feita aquecendo-se a cultura a 60º durante 1 hora, ajustando a turvação á do tubo 3 do nefelometro e acrescentando a cada 0.2 cc. de cultura 1 cc. de mistura de lanolina e oleo de olivas na razão de 0.5:1.0.

TABELA 5

Comparação do valor protetor da vacina *109 T* com o de outras varias

	Doses usadas em 2 inocul.	N.o de gals. inoculadas	N.o de gals. mortas após inoc. de prova
Pasteurella bubaliseptica, morta .	1 cc	10	10
109 T viva	0,3	9	1
109 T com 2 % de formol . .	1 cc	6	5
P 109 (tipo fluor.) - 2 % formol	0,3	9	9
109 T viva	0,0003	5	5
109 T morta - lanolina. . . .	1 cc	6	5
114 (azul espontanea) viva . .	0,3	5	2
Testemunhas não vacinadas. .	—	5	5

DURAÇÃO DA IMUNIDADE CONFERIDA PELA VACINA *109 T*

A imunidade conferida pela vacina *109 T* não é de duração muito longa. Ao fim de quatro meses já está sensivelmente reduzida, conforme se vê na tabela 6.

TABELA 6

Duração da imunidade conferida pela vacina *109 T* (duas doses)

N.o de galinhas	Tempo decorrido entre vacinação e inoc. de prova (dias)	N.o de gal. mortas
5	33	0
2	50	0
3	71	0
3	112	0
4	120	3
4 testem.	(não vacinadas)	4

APLICAÇÃO DA VACINA EM LARGA ESCALA NO CAMPO

Em uma granja situada no Estado de São Paulo (Rocinha) manifestou-se em Abril de 1936 uma grave epizootia de cólera tipo fluorescente, que acarretou 2.300 mortes. Aproveitámos esta oportunidade para experimentar a vacina no campo, inoculando, então, 700 aves com vacina (2 doses de 0.1 e 0.3 cc. respectivamente, intervaladas de 8 dias) e deixando 250 sem vacinar, para controle. A tabela 7 mostra a porcentagem da mortalidade nos dois lotes, nos tres meses

que se seguiram à vacinação, sendo de notar que a maior parte das perdas no lote vacinado ocorreu nos primeiros 15 dias, isto é, no periodo em que a imunidade ainda não se estabelecera.

TABELA 7

Mortalidade comparada em aves vacinadas e não vacinadas, numa granja assolada pela cólera

	N.o de aves	N.o de mortes	% de mortes
Gals. vacinadas	700	70	10 %
Gals. testem. .	250	178	71 %

Nova experiencia do mesmo genero foi feita em outra granja (Jundiaí), na qual a cólera (tambem tipo fluorescente) se manifestou em um grande cercado com 1.168 aves. De Janeiro a Julho de 1935 sucumbiram 656 galinhas, numa mortalidade média de quasi 100 por mês. Das 512 aves existentes em Julho de 1935, 364 foram tratadas com 2 doses de vacina (0.1 e 0.3 cc.) intervaladas de 8 dias, ficando as restantes como testemunhas. O resultado desta experiencia é referido na tabela 8 e abrange um periodo de observação de 3 meses; é interessante notar que a diferença sensivel de mortalidade entre os lotes vacinado e não vacinado apenas se manifesta depois da primeira quinzena após a vacinação, o que confirma experiencias de laboratorio atrás relatadas.

TABELA 8

Mortalidade comparada em aves vacinadas e não vacinadas, num cercado assolado pela cólera (Tres meses de observação)

	Numero global de aves	1.ª quinzena		2.ª quinzena em diante			
		N.o de aves mortas	% de aves mortas	N.o de aves no inicio da 2.ª quinzena	N.o de mortes	Porcentagem de mortes: em relação ao n.o global	Porcentagem de mortes: em rel. ás existent. no inicio da 2.ª quinzena
Gals. vacinadas . .	364	57	15.6	307	5	1.4	1.6
Gals. não vacinadas	148	21	14.2	127	50	33.8	39.4

Em ambos os casos citados, de aplicação da vacina no campo, a imunidade não durou mais de 3 meses e meio, o que está de acôrdo com os resultados obtidos em laboratorio. Ao fim deste tempo, voltaram a ocorrer casos de cólera nas duas granjas, só se conseguindo completa erradicação da molestia pela eliminação de portadores, feita consoante a tecnica por nós descrita em trabalho anterior (3).

INOCUIDADE DA VACINA

Já referimos que a vacina *109 T,* quando inoculada em doses altas (0.5 cc. de cultura de 24 hs. em caldo), por via intramuscular, pode causar a morte do animal; a infecção, que de ordinario fica limitada ao ponto de inoculação, onde apenas provoca necrose local, nesses casos se generaliza.

Em aves cuja resistencia foi sensivelmente diminuida, a inoculação, mesmo de doses pequenas e inocuas em condições normais, pode tambem causar septicemia e morte: assim, galinhas submetidas por tres dias a jejum e resfriamento (pernas mergulhadas em agua) sucumbem quando injetadas com vacina *109 T,* ao passo que os controles (não inoculados) resistem perfeitamente. Galinhas infectadas com *Treponema gallinarum,* ao contrario, não sucumbem quando injetadas no 3.º dia de infecção, com doses de vacina *109 T* comumente usadas para vacinação.

Em todos os animais que sucumbem á infecção pela amostra *109 T* (galinhas, pombos, coelhos, cobaias etc.) a amostra reisolada é sempre do tipo azul, jamais se observando reversão á forma fluorescente original.

Nas duas experiencias de vacinação em larga escala pudemos observar que a pasteurela não é eliminada nem pelas fezes nem pela mucosa bucal, o que confirma experiencias de laboratorio que mostraram que o germe fica localizado no ponto de inoculação. A vacinação, portanto, não cria portadores. Merece ser lembrado, aliás, que, segundo Pritchett e Hughes, as variantes azues obtidas em laboratorio diferem fundamentalmente das raças azues isoladas de casos espontaneos de cólera, pelo fato de não sobreviverem nos hospedadores nem se disseminarem entre as aves que com eles têm contato.

VACCINATION AGAINST FOWL CHOLERA WITH A LIVE SAMPLE (BLUE TYPE) OF "PASTEURELLA AVICIDA".

Abstract

The paper deals with a living vaccine against fowl cholera prepared with a peculiar strain of Pasteurella avicida (strain 109 T) which was obtained through several successive transfers of a typical «fluorescent» strain in broth containing 0.25 % of lithium chloride.

Regarding virulence as well as cultural and serological properties, strain 109 T behaves in exactly the same way as do the strains belonging to Hughes' *«blue» type.*

A very high degree of resistance, both to natural and experimental infection with P. avicida, is afforded by intramuscular inoculation of two doses of the vaccine; each dose consisting of 0.3 cc. of a 24 hour broth culture of strain 109 T. One single dose of the vaccine confers marked immunity only upon 50 to 60 % of the vaccinated birds. When administered by nasal route the vaccine is quite ineffective.

Inoculation of normal doses of the vaccine in healthy animals gives rise to a slight local infection which remains circumscribed to the site of inoculation, not extending to the blood stream, mouth and nasal cavity. On the other hand, generalized infection and death may follow inoculation either of too high a dose of vaccine, or of a normal dose in a bird whose general resistance has been broken by chilling or starving.

Strain 109 T is not able to spread from vaccinated birds to normal ones living in the same pen. A reversion of this strain to the fluorescent type from which it was derived, was never observed.

A marked resistance to infection is only reached three weeks after vaccination. Immunity does not last long, beginning to fade in about $3\,^1/_2$ months. The sera of vaccinated birds agglutinate the «blue type» of P. avicida in diluitions ranging from 1:20 to 1:100.

Killed cultures of strain 109 T have no immunizing value, even when administered together with lanolin. The same holds for some other strains of P. avicida and one strain of P. bubaliseptica, which the Authors used in comparative tests, as well as for many living strains of the «blue type» of P. avicida obtained from spontaneous infections.

BIBLIOGRAFIA

1 — Fabian, F. W. e Mc Cullough, N. B. — 1934 — Dissociation in yeasts. *Jour. Bact.*, **27**, 583-622.

2 — Hughes, T. P. — 1930 — The epidemiology of fowl cholera II. — Biological properties of P. avicida. *Jour. exp. med.*, **51**, 225-238.

3 — Nobrega, P. e Reis, J. — 1937 — Sobre o reconhecimento de portadores na cólera das aves e a persistencia da Pasteurella avicida nesses animais. *Arch. Inst. Biologico*, São Paulo, **8**, 183-188.

4 — Pasteur, L. — 1880 — Hühnercholera. *Klassiker der Medizin*, herausg. von Karl Sudhoff, vol. 30. Leipzig.

5 — Pritchett, I. W. e Hughes, T. P. — 1932 — The epidemiology of fowl cholera. VI — The spread of epidemic and endemic strains of P. avicida in laboratory populations of normal fowls. *Jour. exp. med.*, **55**, 71-78.

6 — Reis, J. e Nobrega, P. — 1936 — *Doenças das Aves* (Tratado de Ornitopatologia), ed. *Inst. Biologico* de S. Paulo, pp. 163-165.

———o———

O PERCEVEJO "HORCIUS NOBILELLUS (BERG)" COMO NOVA PRÁGA DO ALGODOEIRO EM S. PAULO

OBSERVAÇÕES PRELIMINARES

POR

E. J. Hambleton (*)

Do Instituto Biologico de S. Paulo

Com as estampas 12-14

INTRODUÇÃO

Não faz muitos anos que *Horcius nobilellus* (BERG), inséto sugador da familia *Miridae,* até então não constatado no Estado de São Paulo, foi encontrado em certos algodoais de Campinas. Até a cultura atual (1938), nenhum prejuizo de monta foi observado que pudésse ser atribuido ao ataque desse inséto. Aliás varias especies proximas da de que cogitamos, colhidas tambem nos algodoais, apesar de até agora não serem consideradas de importancia economica, poderão de futuro tornar-se prágas prejudiciais. E' desnecessario mencionar que em diferentes partes do mundo outras especies correlatas são tidas como prágas de grande importancia.

Desde que o inséto em questão se tornou responsavel por grandes prejuizos verificados em varias fazendas de Ribeirão Preto, consideramos de utilidade procurar logo conhecer a historia da sua vida e os seus habitos, ainda não descritos.

OBSERVAÇÕES SOBRE "HORCIUS NOBILELLUS" EM CAMPINAS E RIBEIRÃO PRETO, ESTADO DE S. PAULO

Os primeiros especimens colhidos em S. Paulo (Brasil) foram encontrados pelo autor em um pequeno algodoal existente em Campinas, em principios de Fevereiro de 1936. Durante a mesma estação cultural obtiveram-se outros exemplares, em diversas ocasiões, provenientes de outros algodoais situados em diferentes localidades a pequena distancia da cidade. Embora os insétos não fossem numerosos, podiam ser encontrados facilmente, dando a impressão de estarem bem disseminados nas culturas.

Muitas outras especies proximas foram encontradas tambem na mesma época, algumas delas em grande numero e possivelmente alimentando-se da mesma maneira que o *Horcius nobilellus.* Na ocasião em que essas colétas foram realizadas não se verificava prejuizo algum evidente e nenhuma das especies obtidas foi considerada prága de im-

(*) O autor agradece ao Dr. H. H. Knight, Iowa State College, Ames, Iowa, U. S. A., a identificação de *Horcius nobilellus* (Berg).

portancia economica. Em Junho de 1937, o dr. L. O. T. MENDES, assistente técnico da Secção de Entomologia do Instituto Agronomico em Campinas, mencionou ter colhido ninfas e adultos desse inséto em algodoais de Campinas e Marilia.

Em fins de Fevereiro de 1938, o sr. JOHN SHERRINGTON, diretor presidente da Fazenda Dumont, em Ribeirão Preto, chamou-nos a atenção para um caso de *shedding* (queda) anormal, muito intenso, que ocorria geralmente nas areas da fazenda plantadas com algodão. No material remetido para exame, acompanhado por uma carta do sr. SHERRINGTON, e que constava de botões, flôres e maçãs, não foi encontrado um só exemplar do percevejo. Contudo, o exame dos frutos, particularmente nas maçãs novas, mostrou a existencia de picadas feitas por algum inséto sugador. Em 4 de Março, o autor visitou as plantações em Ribeirão Preto, onde uma intensa infestação de *Horcius nobilellus* foi verificada e era extensiva a todos os algodoais da fazenda, causando um prejuizo cuidadosamente estimado em 25 % da colheita. Havia formas adultas e imaturas desse inséto em grande quantidade sobre os botões, flôres ou ainda nos brótos terminais das plantas.

O estrago infligido ás partes florais ou ás maçãs novas da planta, em virtude do modo de alimentação desses percevejos, foi a causa diréta das perdas, originando o *shedding* anormal verificado. Esse *shedding* intenso já tinha ocorrido quando as culturas foram visitadas na data mencionada e, em 30 de Março, um mês mais tarde, quando retornámos á fazenda, praticamente todas as maçãs verdes tinham caído; na maioria dos casos as plantas apresentavam pouca ou nenhuma frutificação nova.

DISTRIBUIÇÃO DA ESPECIE

Embora não tenha sido ainda feita uma pesquisa sistematica de reconhecimento por todas as zonas algodoeiras do Estado, é muito provavel que a especie exista na região compreendida entre Campinas e Ribeirão Preto, ou seja, aproximadamente, 200 Kms. para o norte e para o oeste de Campinas, até Marilia, numa distancia aproximada de 300 Kms. Observações que posteriormente se realizem, virão provavelmente extender essa area consideravelmente, até incluir talvez todas as zonas cultivadas com algodão no Estado. Com relação aos outros Estados do Brasil nada se conhece, até o presente, relativamente á sua distribuição. Parece possivel que a sua disseminação se extenda por todo o sul e sudoeste do Brasil, até a Republica Argentina, onde os primeiros especimens foram colhidos e descritos por BERG (*) em 1883.

(*) BERG, C. — 1883 — Hemiptera Argentina. Anales Soc. Cient. Arg., 16: 21-22.

PLANTAS HOSPEDEIRAS

Em Ribeirão Preto, Est. de S. Paulo, essa especie foi obtida de varias plantas silvestres nas proximidades dos algodoais. Aparentemente o inséto é capaz de subsistir alimentando-se de certas plantas do mato enquanto o algodão não lhe é propicio. Entre as plantas hospedeiras devem ser incluidas, principalmente, diversas especies comuns de Malvaceas. Ninfas e adultos foram colhidos sobre *Sida cordifolia* L., conhecida geralmente como guaxuma branca. Esta, bem como varias outras especies, encontram-se comumente disseminadas pelo Estado. Percevejos adultos têm sido apanhados tambem sobre o picão, *(Bidens pilosa), Sida rhombifolia* L. e uma leguminosa.

Nas visinhanças de Ribeirão Preto, tem o *Horcius nobilellus* possivelmente a sua mais alta atividade, como prága do algodão, em Fevereiro e Março. Outras investigações realizadas em 1938 tendem a confirmar essa suposição. E' digno de nota que a variedade *Express* é plantada com maior intensidade naquela zona, e que foi tambem a unica das observadas, em que os danos por esse inséto foram mais prejudiciais, nesse periodo de cultura.

POSSIVEL IMPORTANCIA ECONOMICA

Apesar de muitos destes insétos terem sido observados e colhidos desde 1936 nos algodoais, a sua atual importancia como uma prága economica não está ainda definitivamente determinada.

Nem é possivel fazer qualquer previsão quanto á importancia futura do inséto, dada a exiguidade das informações até agora obtidas.

A ocorrencia do percevejo nesses algodoais póde ser acidental: talvez uma esporadica atividade de individuos em busca de alimento.

Os adultos são bons voadores e a area de infestação póde ser facilmente ampliada pelo vôo. Na região de Ribeirão Preto, onde o sólo é essencialmente vermelho, algum fator desconhecido, ou determinadas condições podem ter sido excepcionalmente favoraveis ao inséto, talvez durante alguns anos.

Aí a presente situação exige atenção imediata, o que não acontece em outras localidades do Estado, onde o inséto ainda não se manifestou como prága de importancia economica.

Si prejuizos semelhantes aos verificados na presente cultura em Ribeirão Preto continuarem a ocorrer e se extender por outras areas, poderemos então considera-la uma outra grande prága dos algodoais, que formará ao lado da lagarta rosada e da bróca do algodoeiro.

ESTUDOS SOBRE A HISTORIA DA VIDA DO INSÉTO

Ninfas de *H. nobilellus* colhidas no campo foram criadas até a forma adulta, com facilidade, colocando-as em tubos de vidro contendo

botões verdes de algodoeiro. O percevejo adulto não se mantém satisfatoriamente nesse ambiente e por essa razão foi dificil obter dados sobre as atividades da cópula e oviposição nas condições do insetario. Machos e femeas criados em laboratorio em tubos de vidro de 3 cms. de diametro com as duas extremidades tapadas com pano, aparentemente não realizaram a cópula, pois nenhum ôvo foi verificado nem nos brótos terminais tenros, nem nos botões alí colocados para esse fim. Glóbos de vidro maiores, cobertos com pano no topo e com a base enfiada na terra, em vasos de barro, igualmente não ofereceram as condições requeridas pelo inséto. Tambem brótos terminais muito nóvos, possuindo botões, foram colocados e mantidos vivos em tubos com agua e, embora os insétos estivessem providos com a planta hospedeira, bastante humidade e bôa ventilação, nenhum dos especimens criados em laboratorio mostrou qualquer indicação de oviposição nessas condições. Nenhum outro tipo de criação foi experimentado devido a estar-se no fim da estação cultural e haver grande dificuldade na obtenção dos especimens adultos.

DESCRIÇÃO DO ADULTO

Os percevejos vivos são de colorido brilhante, de 4,5 a 5,0 mms. de comprimento e cerca de 2,0 mms. de largura (estampa 12, fig. C). A frente da cabeça, torax e porção interna do corium marginando o clavo, ocraceo ou amarelo sujo. O restante dos elitros, excéto a membrana e raia marginal em grande parte fusco-sanguineo, com numero variavel de manchas amarelas ou esbranquiçadas; membrana em grande parte fusca. O escutelo varia de palido a amarelo brilhante, com a linha mediana bastante alargada anteriormente e de côr fusco-sanguinea; as margens formam um «V» caracteristico. As antenas são fuscas tendendo a preto, cada segmento com um anel basal estreito de côr testacea; o segundo segmento tem um anel testaceo antes do meio. Os olhos são proeminentes e de côr vermelho escura. Patas amareladas irregularmente salpicadas de vermelho; porção apical do femur e basal da tibia posterior, e o anel além do meio, avermelhados; os tarsos, quasi pretos. Superficie ventral amarelo-palida ou ocracea, muitas vezes irregularmente salpicada de vermelho.

HABITOS DA ESPECIE

Os adultos são comumente encontrados a alimentar-se individualmente das porções mais tenras das plantas, mostrando certa preferencia pelos pequenos botões terminais. O inséto consegue o alimento enfiando o rostrum através os tecidos da planta e sugando a seiva. Quando incomodado, o inséto invariavelmente muda de lugar,

procurando rapidamente o lado oposto da planta, ou repentinamente salta e vôa em busca de proteção. Os habitos de alimentação das formas imaturas ou ninfas é semelhante aos do inséto adulto. No campo póde-se facilmente observar ninfas em todos os estadios, alimentando-se nos botões pequenos que se encontram em brótos terminais. Quando ha uma infestação intensa os ultimos estadios pódem ser encontrados nos botões flôrais já crescidos, nas flôres ou nas maçãs em desenvolvimento. As ninfas são muito ativas e movimentam-se com grande facilidade. Até 5 ou 6 individuos já foram observados sobre uma só flôr ou sobre uma maçã, ainda em meio do seu desenvolvimento.

A femea é dotada de um ovipositor semelhante a um serrote com o qual ela é capaz de depositar os ovos dentro do tecido da planta, presumivelmente nos caules verdes. O áto da oviposição não foi presenciado; igualmente não foi possivel conseguir observações mais detalhadas das outras atividades do inséto. Nas condições de laboratorio os especimens de ninfas colhidos no campo e criados até á forma adulta viveram de 18 a 20 dias, nesse estado, durante o mês de Abril.

NATUREZA E EXTENSÃO DO PREJUIZO

Os algodoais nem sempre produzem uma colheita normal. Numerosos fatôres contribuem para que as produções médias sejam fracas, embora as condições do campo tenham sido ideais e o algodoal mostre aparente vigor. Muitos plantadores queixam-se do intenso *shedding* de maçãs novas em certos periodos durante a estação cultural. Até a safra passada foi opinião geral que o *shedding* era ocasionado pela fráca fertilidade do sólo, adubações inadequadas, condições de tempo, etc., mas que os insétos tinham possivelmente pouca relação com esse fáto. O autor (*) já divulgou que a infestação pela lagarta rosada, *Platyedra gossypiella* (SAUND.) nas partes flôrais dos algodoeiros, é responsavel pelo *shedding* de uma elevada porcentagem de maçãs pequenas. Varias especies de *Hemiptera,* largamente distribuidas pelo Estado, provocam indubitavelmente maior quantidade de *shedding* do que atualmente se supõe. E' admissivel, em vista disso, que, após melhores investigações, sejam encontrados ainda outros insétos, que como prágas dos algodoeiros são capazes de determinar o *shedding*.

O prejuizo causado ao algodão pelo ataque do percevejo é manifesto por sintomas caracteristicos, sendo principais: o excessivo *shedding* das maçãs pequenas, o *shedding* das maçãs imaturas e a tendencia para um crescimento eréto anormal. Culturas muito infestadas, visitadas em Abril, mostraram quasi completa ausencia de botões em crescimento, flôres ou maçãs pequenas. Sómente as maçãs formadas

(*) HAMBLETON, E. J. — 1937 — A existencia da *Platyedra gossypiella* (Saund.) na floração dos algodoeiros em S. Paulo, durante 1936-1937. Arch. Inst. Biol., 8: 249-254, figs.

no começo da cultura sobre os galhos mais baixos continuaram na planta. Estas, presumivelmente, escaparam ao ataque na ocasião em que a infestação do percevejo era minima. Nas fotografias que acompanham o artigo mostram-se dois aspétos de plantas infestadas, cujas folhas foram removidas e nas quais se vê a quasi inexistencia de frutificações e o crescimento eréto anormal. Embora o inséto mostre certa preferencia pelos brótos terminais onde a sua alimentação provoca a destruição de grande numero de pequenos *squares* e consequentemente a falta de flôres, o prejuizo proporcionado ás flôres e botões é tambem evidente, como se poderá ver pelas manchas amareladas provenientes do liquido excretado sobre esses orgãos enquanto os insétos se alimentam. Muitas vezes os botões não chegam a abrir direito, ou si o fazem apresentam-se muito deformados, atrofiados e diversamente coloridos. Os pequenissimos frutos desenvolvidos de tais flôres sécam e cáem ao chão logo que as pétalas cáem. Os danos ás maçãs mais desenvolvidas (até $^1/_2$ do tamanho normal) é muito evidente devido ás feridas feitas pelas picadas na superficie dos frutos. Em seguida ás picadas da epiderme as células ao redor dessa área morrem, e permanece uma lesão necrotica pequena, circular, concava e preta. Muitas vezes uma tenue goticula de liquido póde ser vista no centro dessa lesão. Essas manchas necroticas variando de 2 a 3 mms. de diametro, podem ser de formas irregulares, com a superficie elevada, ou ter a forma de pústulas semelhantes á cortiça, quando vistas nos frutos mais velhos que resistiram ao ataque.

Em uma cultura em Ribeirão Preto, plantada em 20 de Novembro de 1937, foram realizadas contagens em 30 de Março de 1938 para se determinar englobadamente a média de botões, flôres ou maçãs existentes em 50 plantas escolhidas avulsamente. Essa contagem revelou uma média de 19,1 por planta, com um maximo de 37 e um minimo de 7. Em 22 de Abril de 1938 esse mesmo campo foi outra vez visitado e nova contagem foi efetuada no mesmo numero de plantas, de identica maneira. Desta vez, ou 23 dias depois da primeira contagem, um intenso *shedding* reduziu a média de 19,1 para 11,1, com um maximo de 24 e um minimo de 0 por planta. Casualmente, ao fazer-se essa segunda contagem, sómente as maçãs maduras ou quasi maduras puderam ser contadas, visto que todas as outras formas tinham caído ao chão, não havendo nenhum desenvolvimento de novas maçãs posteriormente. Desde que esse campo foi plantado, em fins de Novembro, a cultura sofreu um ataque mais intenso do que o algodão plantado mais cedo na mesma zona. A média de prejuizos resultantes do ataque desta especie, nesse campo, póde ser calculada no minimo em 40 % da safra.

THE PLANT BUG "HORCIUS NOBILELLUS (BERG)", A NEW PEST OF COTTON IN S. PAULO.

PRELIMINARY OBSERVATIONS

Abstract

During the past few years Horcius nobilellus (BERG), *a cotton plant bug not hitherto recorded from the State of São Paulo, has been found in a number of cotton fields extending over a rather wide area of the State.*

A serious outbreak of the insect occured in fields at Ribeirão Preto during the season 1937-938, resulting in an estimated loss of at least 25 % of the crop on one large plantation.

Preliminary observations conducted during the latter part of the growing season indicate that the insect may feed on a number of plants, the most important of these belonging to the Malvaceae, namely Sida cordifolia L. *and S. rhombifolia* L.

The injury to cotton resulting from attack by this plant bug is manifested by excessive shedding of small squares and immature bolls, and the tendency to rather abnormal tall growth.

The nymphs and adults are active feeders on the terminal growths, squares, blossoms and immature bolls.

Field counts made in one field planted in late November indicated that the average number of fruiting forms per plant had dropped from 19.1 to 11.1 forms during a period of 23 days. Thus in late planted fields losses resulting from attack by this insect were more severe.

———o———

EXPLICAÇÃO DAS FIGURAS

Estampa 12

Fig. A — Maçãs imaturas mostrando as picadas e manchas necroticas feitas pelo percevejo, *Horcius nobilellus* (Berg) $\times 0{,}4$.

Fig. B — Uma série de botões flôrais caidos dos algodoeiros infestados pelo percevejo do algodoeiro. $\times 3$.

Fig. C — O percevejo adulto, *Horcius nobilellus* (Berg) $\times 11$. (Fotos do autor).

Estampa 13

Fig. D — Algodoeiros cujas folhas foram removidas, mostrando o aspéto caracteristico de plantas prejudicadas pelo *Horcius nobilellus*.

Fig. E — Algodoeiros prejudicados pelo inséto, mostrando a quasi inexistencia de maçãs e o crescimento eréto anormal. (Fotos de B. Mazza).

Estampa 14

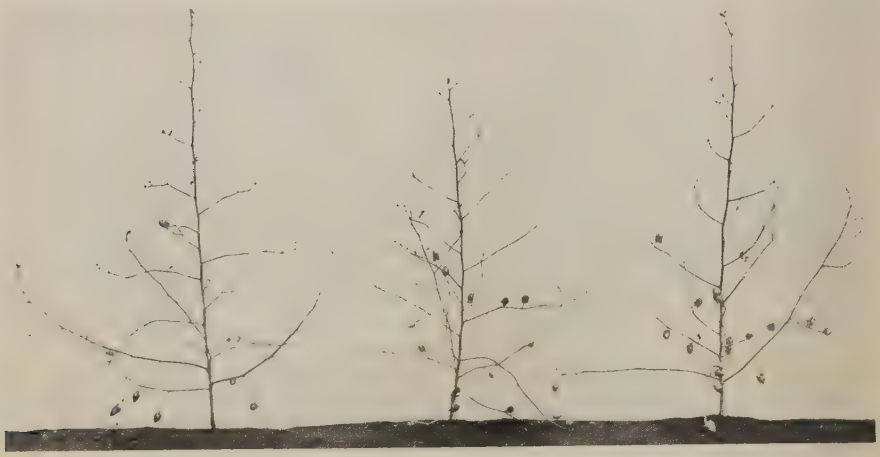
Fig. F — Algodoeiro de quasi 2 metros de altura, atacado pelo percevejo, com o crescimento excessivo, e com pequena produção de maçãs na parte inferior, e inexistencia compléta na parte superior.

Fig. G — Vista parcial de um algodoal com plantas de crescimento anormal causado pela infestação de *Horcius nobilellus*. (Fotos de B. Mazza).

A

B

C



D

E

F

G

NOTAS BIOLOGICAS SOBRE "MIMORISTA CAMBOGIALIS (GUEN.)" LEP. PYRAUST.

POR

H. F. G. Sauer

Do Instituto Biologico de S. Paulo

Com 3 figuras no texto e estampa 15

INTRODUÇÃO

As notas sobre a biologia desta especie foram obtidas, principalmente, durante Março e Abril de 1937, sob a temperatura de 23°,6 C. O hospedeiro preferido é *Pereskia grandiflora* HOWARD (F. C. HOEHNE, det.). O Dr. W. SCHAUS, do Museu Nacional dos Estados Unidos, a quem remetemos especimens para identificação, informa a sua alimentação sobre cactus.

OVIPOSIÇÃO

Em laboratorio, durante um periodo de vida de 25 dias em média, as femeas depositaram uma média de 248 ovos, com um maximo de 301 e um minimo de 128 ovos. Oito individuos, acasalados logo após atingirem o estado adulto, iniciaram a postura entre 2 e 4 dias. A oviposição foi feita sempre ao anoitecer, ocasião em que os adultos se mostraram mais ativos. A maioria dos ovos foi depositada na face inferior da folha, quasi sempre isoladamente. O numero de ovos num grupo nunca excedeu de 5, sendo mais comuns agrupamentos de 2 e 3. Quando em grupo os ovos se superpõem como escamas. Não estão protegidos.

No campo só se verificaram posturas isoladas. As folhas abrigadas ou as extremidades das brotações que darão as flôres parecem ser os pontos preferidos para a desova.

O ovo (fig. 1) mede em média 1,007 mms. por 0,698 mms. E' oval arredondado, achatado, com margem delicada. Chorion pouco resistente, transparente, reticulado e irisado. Côr branca.

No segundo dia a coloração torna-se amarelada; a margem do ovo fica livre. No terceiro dia já se observam os ocelos de côr castanha. Horas antes do nascimento vêem-se a lagarta e seus movimentos, distintamente: cabeça castanha, ocelos castanho-escuros e mandibulas castanho-claro. As lagartas comem certa porção do chorion, o suficiente para poder sair do ovo, deixando a casca branca e irisada. O periodo de incubação é de 3,5 a 4 dias.

HABITOS DA LAGARTA

Depois da eclosão as lagartas dispõem as cerdas com o aparelho bucal, procuram abrigar-se da luz direta, tecem uma ligeira proteção numa reentrancia da folha, junto a uma nervura ou na axila da folha, de uma brotação nova, do pedunculo da flôr ou do fruto, e iniciam a alimentação. A' medida que se desenvolvem constroem abrigo mais solido já dobrando as folhas mais novas e delicadas, já superpondo duas folhas, ou ainda reunindo folhas secas. E' comum observar-se nos pedunculos das folhas, flôres ou frutos um tecido de teia em mistura com detritos vegetais e excrementos. Nos primeiros estadios as lagartas preferem a face inferior das folhas, para a alimentação, deixando a epiderme superior. Nos ultimos estadios comem parte da nervura principal, provocando o amarelecimento e a morte delas; tambem perfuram os botões florais, o pedunculo das flôres ou dos frutos ou ainda a parte mais tenra das brotações, fazendo uma galeria e provocando a morte de cada uma dessas partes, com o que dão á inflorescencia um aspéto caraterístico e desagradavel, prejudicando a floração e frutificação e tambem o desenvolvimento da planta (estampa 15, fig. B). Muitas proteções inicialmente utilizadas por uma lagarta são aproveitadas por outras, e os casulos são tecidos nessas proteções. As lagartas são pouco ativas e têm o corpo com aparencia humida.

CICLO DE VIDA

A duração do ciclo de vida, desde ovo até adulto, foi, em média, nos mêses mencionados, de 30 dias, assim distribuidos: 4 dias para incubação do ovo, 13 dias de vida larval, 3 dias em prepupa e 10 dias crisalida. Os adultos viveram, em laboratorio, 25 dias em média, o que fornece um total de 53 dias desde a postura até a morte dos adultos. Nos mêses de inverno a duração das fases imaturas é grandemente aumentada, influenciada pela baixa temperatura. O periodo, nessa época, de ovo a adulto, foi de 68 dias.

TABELA 1

Duração dos estadios de *Mimorista cambogialis* (GUEN.)
Durante Março e Abril de 1937, Campinas

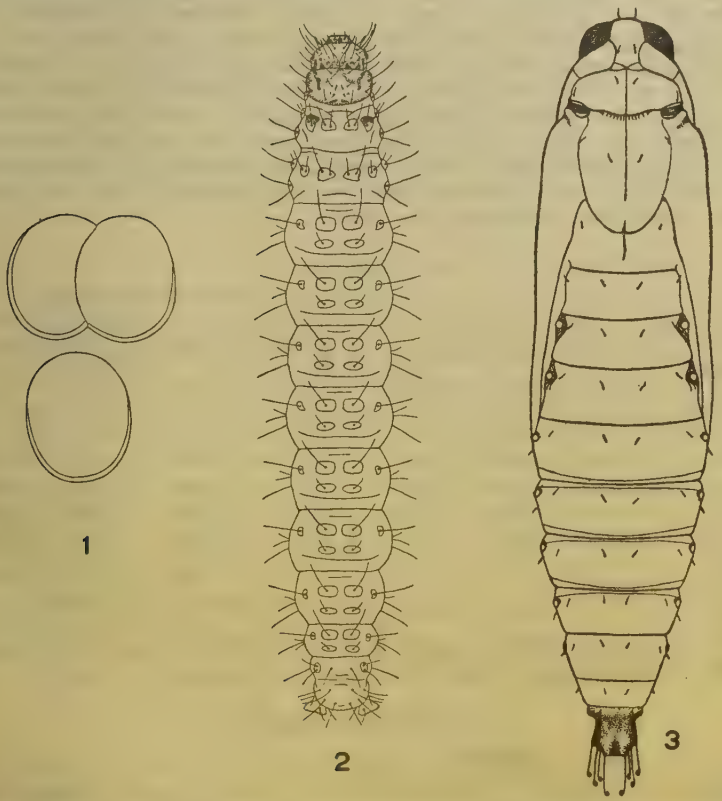
Estadios	Duração em dias			N.o de individuos
	Maxima	Minima	Média	
Ovo	4,0	3,5	3,78	42
Larval.	16,0	11,0	13,0	12
Prepupal.	4,0	2,0	3,4	18
Ninfal.	12,0	6,0	10,0	18
Ovo até adulto . .	33,0	24,0	30,0	26

ESTADIOS DA LAGARTA

Cinco foi o numero de estadios para as lagartas de *Mimorista cambogialis* (GUEN.). Na tabela 2 menciona-se a duração de cada um, bem como as larguras respetivas das capsulas da cabeça.

1.º estadio — Cabeça amarela, lisa; mandibulas castanho-claras; ocelos castanho-escuro; sutura castanha; margem posterior, atrás dos ocelos, com mancha pardo-escura. Corpo amarelado; cerdas finas e compridas. Após se alimentarem, o corpo torna-se esverdeado e os tuberculos, fusco-claro.

2.º estadio — Cabeça amarelo-pardacenta com grupos de manchas mais escuras. Corpo amarelado, esverdeado pelo conteúdo, liso; escudo do primeiro segmento toraxico amarelado, com tonalidade esverdeada e manchas pardas; segundo e terceiro segmentos do torax com tuberculos 2 mais escuros que os demais, com uma mancha pardo-escura na porção anterior; tuberculos restantes fusco-claro; cerdas compridas e palidas.



Mimorista cambogialis (GUEN.) Fig. 1 — Ovo, augmentado 20 ×. Fig. 2 — Lagarta adulta, augm. 6 ×. Fig. 3 — Crisalida, augm. 12 ×.

3.º estadio — Semelhante ao segundo. Escudo do primeiro segmento toraxico com as margens laterais e posterior pardacentas. Tuberculos abdominais de coloração identica ao corpo, pouco proeminentes, lisos, brilhantes.

4.º estadio — Semelhante ao terceiro, com as partes mais detalhadas. Tuberculos do corpo pardo-amarelados, levemente orlados de pardo mais escuro. Tuberculos dos segundo e terceiro segmentos toraxicos bem mais pardos que os demais, notando-se que a mancha anterior pardo-escura só prevalece nos tuberculos 2 do segundo segmento. Os tuberculos descolorem-se gradativamente, do torax para o abdomem. Cerdas pardo-claras inseridas numa área clara da região central parda do tuberculo.

5.º estadio — (Fig. 2) Cabeça amarelo pardacenta, lisa, brilhante, com grupos de manchas pardas; sutura castanha; esclerite adfrontal marginada por uma linha esbranquiçada; margem posterior castanho-escura com uma mancha preta na região posterior aos ocelos; ocelos pretos. Corpo liso, esverdeado pelo conteúdo; escudo do primeiro segmento toraxico com margens posterior e laterais pardacentas; côr amarelada com manchas pardas. Tuberculos dos segundo e terceiro segmentos toraxicos pardos, bem visiveis, sendo os do segundo mais pronunciados que os do terceiro; tuberculos 2 do segundo segmento toraxico de côr preta na porção anterior; demais tuberculos pardacentos ou quasi identicos ao corpo, pouco salientes, lisos, orlados de pardo. Cerdas supraespiraculares geralmente mais compridas; as cerdas sáem de uma area clara na porção central parda dos tuberculos. Placa anal da mesma côr do corpo, com manchas pardas. Do segundo ao oitavo segmentos abdominais os tuberculos 1 têm uma mancha parda anteriormente á inserção da cerda.

TABELA 2

Duração dos estadios da lagarta e largura das capsulas da cabeça

Estadio	Duração em dias			N.º de individuos	Largura da capsula da cabeça em mms.		
	Maxima	Minima	Média		Maxima	Minima	Média
I	3	1,5	2	42	0,251	0,220	0,239
II	3	1,5	2	27	0,351	0,337	0,345
III	4,5	2,0	2,3	27	0,542	0,441	0,508
IV	4,0	2,0	2,3	25	0,903	0,823	0,863
V	5,0	4,0	3,5	18	1,224	1,144	1,190

Para a crisalidação a lagarta se descóra, passando a branco-amarelado ou creme, tornando-se mais visiveis os tuberculos, principalmente os toraxicos.

CASULO E CRISALIDA

No campo encontramos o casulo tecido na propria proteção construida pela lagarta. E' tecido com seda branca levemente amarelada; é tenue e delicado. Desde o ovo até o encasulamento foram precisos 14 dias, em média. A prepupa é amarelada ou creme.

A crisalida (fig. 3) mede, em média, 8,95 mms. de comprimento por 2,4 mms. de largura. Logo depois de formada é amarelo-creme, tornando-se finalmente castanha. Vista com aumento o tegumento apresenta-se finamente pontuado. As suturas castanho-escuras demarcam distintamente os diferentes orgãos.

Cabeça arredondada, com 2 cerdas surgindo da fronte e duas outras situadas proximo á inserção das antenas, de onde sáem 2 linhas que se encontram na região dorsal pouco acima da sutura anterior do protorax, partindo desse ponto uma linha dorsal e mediana que se extende até o metatorax. Protorax e mesotorax com 2 pares de cerdas e metatorax com 1 par sómente. Na união do protorax e mesotorax existe, de cada lado, um processo proeminente, liso e brilhante, onde os estigmas do mesotorax se localizam. Estes são castanho-escuros e possuem pêlos castanhos e brilhantes, e estão situados sobre uma cavidade.

1.º, 2.º, 3.º e 9.º segmentos abdominais com 2 pares de cerdas; 4.º e 8.º segmentos com 3 pares; e do 5.º ao 7.º cada segmento possue 4 pares de cerdas.

Os estigmas são de forma oval, com bordos salientes, mais proeminentes na região anterior, estando os situados nos 2.º e 3.º segmentos abdominais, entre as rugas do segmento.

O orificio anal fica imediatamente sob o cremaster, que é um processo forte, castanho escuro, com 8 filamentos compridos, castanhos e com a extremidade recurvada, surgindo imediatamente de baixo das saliencias angulares do cremaster.

DESCRIÇÃO DO ADULTO

De um modo geral o adulto (estampa 15, fig. A) poderá ser descrito da maneira seguinte:

Envergadura, 16 a 21 mms.; comprimento do corpo, 7 a 9 mms. Cabeça com a região frontal amarelo-parda marginada por duas faixas brancas que, surgindo da mancha branca onde estão inseridos os ocelos e antenas, se encontram anteriormente; palpos com a metade superior amarelo pardacento e metade inferior branca; antenas filiformes, levemente pubescentes na femea e mais fortemente no macho. Corpo com a região dorsal amarela e a ventral branca a creme, brilhante. Asas com a face dorsal amarelo-goma guta, uniforme e luzidia, pouco mais clara na face ventral; margem apical com pontuações pardo-ferrugineas e franjas amarelas. No 1.º par distinguem-se 3 linhas pardas, denteadas, equidistantes entre si e que dividem as asas em 4 porções semelhantes; a face ventral possue 2 linhas pardas, pouco distintas. Na região superior das asas posteriores veem-se 2 linhas pardas, palidas; face inferior com a margem de uma tonalidade alaranjada. Patas de coloração branca a creme, brilhante; as anteriores têm a coxa e tibia pardacentas no lado interno, bem como o primeiro articulo tarsal onde essa côr se evidencia mais.

INIMIGOS NATURAIS

As seguintes especies de himenopteros foram obtidas parasitando esse Piraustineo:

Atacando as lagartas: *Perilampus* sp. (A. B. Gahan, det.), *Chelonus busckiella* Vier. e *Hormius* sp. (C. F. W. Muesebeck, det.).

As duas ultimas especies e notadamente a ultima são muito comuns.

De crisalidas foram criados exemplares de *Brachymeria ovata* Say, encontrados em grande abundancia.

BIOLOGICAL NOTES ON "MIMORISTA CAMBOGIALIS (Guen.)," LEP. PYRAUST.

Abstract

In this paper the author presents some data concerning the Pyralid M. cambogialis (Guen.), *a pest feeding on Pereskia, grandiflora* Howard *in the State of S. Paulo, and includes the names of its natural enemies.*

———o———

Fig. A — *Mimorista cambogialis* (GUEN.) ♀ × 4,4

Fig. B — *Pereskia grandiflora* HOWARD, mostrando em *a* uma planta muito atacada pelas lagartas de *M. cambogialis* (GUEN.) (A. Federman, fot.)

Vol. 9 — Art. 11 Setembro de 1938

OBSERVAÇÕES COMPLEMENTARES SOBRE O PAPEL DOS COMPONENTES DA ALEXINA NA REAÇÃO DE WASSERMANN

POR

O. Bier

Do Instituto Biologico de S. Paulo

Em um trabalho anterior (1), estudámos o efeito da adição dos varios componentes do complemento ao complexo antigeno-reagina sifilitica e mostrámos que se póde obter, desse modo, uma definida negativação de reações de Wassermann positivas. O sôro de cobaia inativado pelo levedo foi o que mais eficaz se revelou a este respeito, seguindo-se-lhe em ordem de eficacia o sôro inativado pela amonea e o sôro aquecido a 56°. Este ultimo, em identicas condições de técnica, só é capaz de tornar negativas reações condicionadas por sôros particularmente pobres em reagina.

A interpretação desses fatos foi dada á luz dos conhecimentos recentemente adquiridos sobre a ordem de fixação e o consumo das distintas frações da alexina na reação de Wassermann.

Segundo Cruz e Penna (2), os diversos componentes da alexina aderem ao complexo antigeno-anticorpo na seguinte ordem: 4.° componente, fração globulina, fração albumina e 3.° componente.

Nas reações de fixação do complemento, sabe-se, desde os trabalhos, já antigos, de Skwirsky (1910), que sómente a fração globulina é consumida, ao passo que a fração albumina permanece livre e ativa.

Dos componentes termoresistentes, segundo os resultados concordantes de Deissler (3), de Misawa, Ohta e Imahori (5) e de Bier (1), nas reações fortemente positivas, é consumido principalmente o 4.° componente, pois a recuperação da atividade alexica sómente se dá pela adição de sôro inativado pelo levedo.

Bier (1935) conseguiu distinguir quatro diferentes gráos de positividade do sôro sifilitico, de acôrdo com a possibilidade de reativação da quantidade residual de alexina pelos componentes do complemento: +, o gráo mais fraco de positividade, correspondente a sôros que, em virtude de um teôr muito fraco em reaginas, seriam incapazes de consumir completamente as frações labeis do complemento. O sôro ++ fixaria a totalidade das frações labeis, porém não consumiria completamente nem o 3.°, nem o 4.° componente, razão pela qual não poderia ser negativado pelo sôro-56°, porém o seria quer pelo sôro-amonea, quer pelo sôro-levedo.

O sôro +++ é o que só se deixa negativar pelo sôro-levedo, pois consome integralmente o *Mittelstück* e o 4.° componente.

Finalmente, o sôro ++++ corresponde ao mais alto gráo de positividade e não se deixa negativar nem mesmo pela adição de sôro-levedo.

Todavia, EAGLE, que tambem verificou o efeito negativante da adição de sôro aquecido a 56°, interpreta-o simplesmente como o resultado da adsorção de um filme de proteina em torno das particulas do complexo A-A, de modo a isolar-lhes a superficie complementofila.

Segundo EAGLE, é a esse fato que deve ser primariamente atribuido o fenomeno de zona nas reações de fixação do complemento, bem como a maior sensibilidade da reação de Wassermann quando a incubação é feita na geladeira, pois, de acôrdo com os resultados experimentais daquele autor, a negativação pelo sôro não se opera significantemente em baixa temperatura.

Experiencias complementares são apresentadas neste trabalho, afim de esclarecer os pontos seguintes:

I) Deve a ação negativante do sôro 56° ser primariamente atribuida á adsorção de um filme de sôro proteina em torno do complexo A-A ou, antes que a uma reconstituição da alexina?

II) A ação negativante do sôro-amonea e do sôro-levedo pódem ser explicadas por uma soma de efeitos de complementos parcialmente inativados, diferindo apenas quantitativa e não qualitativamente?

III) Que papel desempenham os componentes termoresistentes do complemento (sôro-56°) no fenomeno de zona observado na reação de Wassermann?

MATERIAL E METODOS

A técnica de preparação dos varios componentes do complemento foi a mesma indicada em trabalhos anteriores.

Para as reações de Wassermann usamos o antigeno de EAGLE e a técnica recomendada por este autor.

As titulações de complemento foram feitas observando o tempo requerido para a hemolise total, de acôrdo tambem com a técnica recomendada por EAGLE.

PARTE EXPERIMENTAL

1 — Mecanismo da ação negativante do sôro normal inativado, segundo as condições experimentais.

Examinando uma série de sôros Wassermann — positivos, em relação ao efeito negativante da diluição em série em sôro normal inativado, pudemos verificar, tal como EAGLE, que, em tais condições a fixação do complemento é inibida com absoluta regularidade.

Tais condições de técnica são, entretanto, muito diferentes das que empregámos em trabalho anterior. Com efeito, si o sôro-56° fôr adicionado, em pequena quantidade (0,1 cc.) ao complexo antigeno-anticorpo, após incubação a 37° 1 hora ou a 0° 4 horas, precedendo imediatamente a adição dos globulos sensibilizados, sómente uma pe-

quena porcentagem de sôros positivos (os particularmente pobres em reagina) se deixam negativar pelo sôro inativado.

Dado o fato de, nas condições de técnica acima referidas, já ter havido o consumo do complemento, deve evidentemente o efeito negativante do sôro a 56°, em tais circunstancias, ser atribuido a uma reconstituição da alexina residual ou de alguma de suas frações.

2 — A alexina residual da reação de Wassermann difere qualitativamente do complemento diluido.

A concepção dos componentes do complemento não é aceita por numerosos autores, que consideram a reconstituição da atividade alexina pela combinação dos distintos componentes meramente como o resultado da soma de efeitos de complementos parcialmente inativados.

Eagle verificou que tanto a fração globulina, como a fração albumina são parcialmente destruidas pelo levedo. Ajuntando-se ao sôro inativado pelo levedo um definido excesso quer da fração albumina, quer da fração globulina, obtém-se reconstituição da atividade alexica.

A destruição do *Mittelstück* e do *Endstück* pelos reativos inativantes do 3.° componente é, todavia, contestada pelos antigos trabalhos de Sachs e Omorokow (1911), Omorokow (1911) e Ritz (1912) para o veneno de cobra e por Coca (1914), para as emulsões de levedo.

De nossa parte, temos sempre observado que o sôro inativado pelo levedo, quando completado pelo sôro a 56°, não determina hemolise tão rapida como, em condições analogas, o sôro tratado pela amonea.

Este fato póde, entretanto, ser interpretado admitindo-se que o levedo, ao mesmo tempo que inativa o 3.° componente, determina tambem uma certa alteração das frações labeis ou desenvolve um certo poder anticomplementar, o que faz com que o complemento não possa ser reconstituido quantitativamente.

Eagle conclúe de sua experiencia acima citada que é desnecessario postular a existencia de um 3.° componente da alexina, dado que um excesso quer do *Mittelstück,* quer do *Endstück* póde ativar a quantidade residual de um daqueles factores presentes no sôro levedo. Tal experiencia póde, porém, ser tambem interpretada, admitindo-se que o 3.° componente seja veiculado tanto pela fração globulina, quanto pela fração albumina, embora as pesquisas já antigas de Ritz (1912) e as de Takenomata (1924) indiquem que o 4.° componente se encontre predominantemente no *Endstück,* e o 3.° componente sobretudo na fração globulina.

Procurámos verificar si a idéa de uma reconstituição por soma de efeitos de complementos parcialmente inativados poderia ser tambem aplicada ao sôro inativado pela amonea.

Exp.: 3 cc. de sôro fresco de cobaia são repartidos em 3 tubos: ao tubo 1, adicionam-se 0,25 de amonea n/6,5; aos tubos 2 e 3, nada se adiciona. O tubo 3 é colocado em banho maria a 56° durante $^1/_2$ hora, ao passo que os tubos 1 e 2 são mantidos na estufa a 37° durante 30 minutos. Após esse intervalo, 0,25 de HCl n/6,5 são ajuntados ao tubo 1 e a cada um dos tubos 1, 2 e 3, adicionou-se suficiente agua fisiologica para completar o volume a 10 cc. (diluição 1/10).

O quadro seguinte mostra os resultados observados em relação á atividade alexica das misturas de sôro inativado pelo calor e pela amonea, em comparação com a do sôro fresco original.

TABELA 1

Reconstituição da atividade alexica do sôro-amonea pelo sôro-56°.

	Tempo da hemolise, em minutos, para diferentes quantidades de complemento:		
	0,8	0,6	0,2
1) Sôro fresco 1/20	2,5	5	11
Mistura de: 2) 1 p. sôro-56° 1/10 1 p. sôro-amonea 1/10	6	11	∞
3) 1 p. sôro-56° 1/10 9 p. sôro-amonea 1/10	20	∞	∞
Controles	∞		
4) sôro-amonea 1/10	traço de hemolise	—	—
5) sôro-56° 1/10	após ½ hora.	—	—

Ressalta, pois, que a mistura em partes iguais de sôro-amonea + sôro-56° tem uma atividade alexica sensivelmente correspondente a 50 % da do complemento original. Tudo se passa como si tivesse havido, ao mesmo tempo que a destruição completa do 4.° componente, a inativação de 50 % das frações labeis do complemento.

Si se faz, porém, a mistura apenas de 1 p. de sôro-56° para 9 p. de sôro-amonea, o complemento resultante é muito mais fraco que a mistura em partes iguais. De acôrdo com a idéa de que o sôro-amonea fosse um complemento parcialmente inativado, que diferiria apenas quantitativa e não qualitativamente do sôro inativado pelo calor, dever-se-ia concluir que a inativação pela amonea destruiria sensivelmente mais complemento que a inativação pelo calor. Ora, tal não é o caso, pois o sôro amonea empregado, em virtude de se ter feito agir a amonea sómente durante $^1/_2$ hora, não estava completamente inativado, dando traço de hemolise após $^1/_2$ hora a 37°. Além disso, si considerarmos o comportamento do sôro-amonea e do sôro-56° em relação a um 3.° reativo, nomeadamente o sôro inativado pelo levedo, verifica-se que a reconstituição da atividade alexica é muito mais pronta com o sôro-amonea que com o sôro inativado pelo calor. A interpretação possivel para a experiencia acima é a que toma em consideração a existencia dos distintos componentes da alexina: quando se mistura 1 p. de sôro-56° a 9 p. de sôro-amonea, a quantidade do 4.° componente no sôro-56° (o 4.° componente é o primeiro elemento que se fixa aos globulos sensibilizados) é insuficiente para reativar quantitativamente o complemento residual existente no sôro-amonea.

A negativação da reação de Wassermann mediante a adição dos varios componentes da alexina não póde, entretanto, ser explicada de acôrdo com a idéa da inativação parcial do complemento considerado como um todo. Realmente, si se estuda o efeito da adição dos varios componentes da alexina sobre o teôr alexico de diferentes diluições de sôro fresco de cobaia e, comparativamente, ao complemento residual deixado por quantidades variaveis do complexo A-A, obtêm-se curvas de velocidade de hemolise totalmente diversas nos dois casos.

Exp.: A 4 séries de tubos contando quantidades variaveis de complementos frescos de cobaia, adicionam-se respetivamente 0,1 de NaCl 0,9 %, sôro-56° 5 minutos, sôro-levedo e sôro-amonea e, após haver igualado os volumes, 0,8 cc. de globulos sensibilizados.

As velocidades de hemolise observadas figuram na tabela seguinte:

TABELA 2

Efeito da adição dos componentes do complemento sobre a atividade do sôro fresco de cobaia.

Quantidade de sôro fresco de cobaia 1/10	NaCl	56°	Levedo	Amonea
0,4	4	3,6	4	4
0,2	6	5	6	4
0,1	8,5	7,5	27 (Zona de ação anti-complementar)	5
0,05	31	27	∞ (Zona de ação anti-complementar)	7

Vê-se, pois, que o sôro-amonea é o que mais influencia a velocidade de hemolise pelas varias diluições do sôro fresco, o que facilmente se compreende quando se considera que ao sôro-amonea falta sómente o 4.° componente da alexina, que póde ser suprido pelo sôro fresco mesmo em altas diluições, dada a sua particular abundancia no sôro de cobaia.

O sôro-levedo não exerce ação significante, visto que lhe falta o 3.° componente, no qual o sôro de cobaia é já deficiente. Nota-se tambem na tabela acima que o sôro-levedo, em presença de pequenas quantidades da alexina, exerce uma notavel ação anticomplementar.

Experiencias comparativas foram feitas adicionando-se os varios componentes da alexina ao complemento residual deixado por quantidades decrescentes de sôro sifilitico em presença de uma quantidade constante de antigeno (tab. 3).

TABELA 3

Reconstituição da alexina residual deixada pelo complexo A-A sifilitico pelo sôro-amonea e pelo sôro-levedo.

Sôro sifilitico		NaCl	Sôro - amonea	Sôro - levedo
				(1)
1/10	0,5	∞	∞	30
	0,25	∞	∞	30
	0,125	∞	∞	30
1/100	0,5	∞	∞	9,5
	0,25	∞	12	7,5
	0,125	∞	7,5	6
1/1000	0,5	11	6,5	6
	0,25	6	6	6
	0,125	8	5,5	6

(1) Tempo da hemolise em minutos.

Vê-se, pois, que o complemento residual da reação de Wassermann difere qualitativamente do complemento diluido: o 1.º se deixa facilmente reativar pelo sôro-levedo, não sendo quasi reativado pelo sôro-levedo, ao contrario do que se observa com o complemento diluido.

3 — Comparação do efeito inibidor do sôro normal inativado e do sôro previamente tratado pela amonea e aquecido a 56º.

Eagle atribue primariamente a causa do fenomeno de zona na reação de Wassermann a um excesso de sôro inibidor sobre a dose presente de reagina e conclúe que as fracas reações de Wassermann aparecem frequentemente como negativas com as técnicas usuais, em virtude do mesmo efeito inibidor.

Fizemos uma série de experiencias para esclarecer si o efeito inibidor responsavel pelo fenomeno de zona era devido á adsorção de um filme de proteina em torno do complexo A-A ou si deveria ser atribuido á ação do 4.º componente da alexina.

Uma série de sôros sifiliticos foi diluida a 1/5 e a 1/30 em:

a) NaCl 0,9 %.
b) Sôro negativo 1/2 inativado a 56º 10 min.
c) Sôro negativo inativado pela amonea durante 10 min. e aquecido mais 10 min. a 56º (diluição final 1/2).

Com tais soluções de reagina foi então praticada a reação de Wassermann, com o resultado seguinte: (tab. 4).

TABELA 4

Comparação do efeito inibidor do sôro normal inativado e do sôro previamente tratado pela amonea e aquecido a 56º.

Sôro n.º	Quantidades de sôro: 0,5	0,25	0,125	0,08	0,04
666 1/5 a (NaCl)	0	0	0	0	4
b (56º)	4	4	4	4	4
c (52ºam)	4	4	4	4	4
1/30 a	0	4	4	4	4
b	4	4	4	4	4
c	4	4	4	4	4
668 1/5 a	0	0	0	0	0
b	0	0	0	0	0
c	0	0	0	0	0
1/30 a	0	0	0	4	4
b	4	4	4	4	4
c	4	4	4	4	4
672 1/5 a	0	0	0	0	0
b	4	3	1	0	0
c	0	0	0	0	0
1/30 a	0	0	4	4	4
b	4	4	4	4	4
c	4	4	4	4	4
701 1/5 a	0	0	2	4	4
b	4	4	4	4	4
c	4	4	4	4	4
1/30 a	4	4	4	4	4
b	4	4	4	4	4
c	4	4	4	4	4

0 — Hem. nula. 4 — Hem. total. 1, 2 e 3 — Gráos intermediarios.

Os resultados precedentes indicam que o efeito negativante do sôro normal inativado, em condições de técnica semelhantes ás empregadas por EAGLE, não deve ser atribuido ao 4.º componente da alexina, pois, com excepção de um caso (sôro 672) tanto se obteve usando como diluente o sôro normal aquecido a 56º como com o sôro previamente inativado pela amonea.

Verdade é que a inativação pela amonea, na experiencia precedente, deve ter sido apenas parcial, em virtude de se ter feito agir a amonea sómente durante 10 minutos. Todavia, como já acentuámos em

trabalho anterior, com o sôro humano, o tempo de inativação pela amonea não póde ser prolongado além daquele tempo sem que se desenvolva, em certos sôros, uma ação anticomplementar.

Digno de nota é o resultado obtido com o sôro 672: diluido a 1/5 em sôro 56º houve inibição de fixação nos dois primeiros tubos, ao passo que o mesmo sôro diluido em sôro 56º amonea não apresentou tal zona.

Observação da mesma ordem foi feita tambem em outros sôros, nas seguintes condições de técnica: A 3 tubos contendo 0,05 cc. de sôro Wassermann positivo, adicionam-se 0,35 de NaCl, sôro 56º e sôro amonea. Segue-se adição de 0,4 de antigeno de Eagle 1/120 e 0,4 compl. 1/20.

Incubação de 3 horas e 0º. O resultado observado foi o seguinte (tab. 5).

TABELA 5

Efeito inibidor comparativo do sôro inativado e do sôro previamente tratado pela amonea e aquecido a 56º.

Sôro n.º	NaCl	Sôro 56º	Sôro 56º amonea
629	1	4	4
652	0	4	1
591	0	4	0
617	0	4	4
566	0	4	0

Destas observações resulta que o efeito inibidor do sôro normal inativado, condicionando o fenomeno de zona e mascarando reações fracamente positivas, não deve ser sómente atribuido a um fenomeno fisico quimico inespecifico, como seja a adsorção de um filme de proteina em torno das particulas do complexo A-A, mas que, em certos casos, a intervenção do 4.º componente da alexina parece desempenhar papel preponderante.

Neste sentido falam, em particular, as experiencias já referidas em trabalho anterior relativas ao desmascaramento da reagina sifilitica pela retirada do 4.º componente da alexina.

SUMARIO E CONCLUSÕES

Na reação de Wasserman, o complemento não é fixado como um todo, porém electivamente certos de seus componentes, em particular, o 4.º componente e a fração globulina.

Esse fato é evidenciado muito claramente quando se estuda o efeito da adição de sôro-amonea e de sôro-levedo respetivamente a uma série de diluições de complemento fresco ou ao complemento residual deixado por quantidades variaveis de complexos A-A: no 1.º caso a reativação se dá com o sôro-amonea, no 2.º, com o sôro-levedo. Este fato indica deficiencia de 3.º componente no sôro fresco diluido e de 4.º componente no residuo de complemento da reação de Wassermann.

Neste trabalho apresentam-se evidencias de que a inativação do sôro pela amonea e pelo levedo devem ser atribuidas á retirada de componentes termoresistentes distintos e não á soma de efeitos de complementos parcialmente inativados. Do mesmo modo, a impossibilidade de se revelarem pequenas quantidades de reagina em presença de um excesso de sôro, é explicavel não só pelo efeito fisico-quimico exercido pelas sôro-proteinas, bloqueando a superficie complementofila do complexo A-A, mas tambem pelo poder negativante do 4.º componente da alexina.

FURTHER INVESTIGATIONS ON THE ROLE OF THE COMPONENTS OF THE COMPLEMENT IN THE WASSERMANN REACTION.

Abstract

In the positive Wassermann Reaction, an elective fixation of certain Components of the Complement take place, namely the midpiece and the 4th component.

The diluted fresh guinea pig serum is deficient in regard to the 3d. component, while the residual complement left by an antigen-antibody complex is deficient in regard to the 4th component.

Evidences are presented in this paper that the inactivation of the complement by amonia and by yeast emulsions is dependent on the destruction of distinct components and can not be explained by the sum of effects of partially inactivated complements. Moreover the impossibility of detecting small amounts of Reagin in the presence of an excess of serum must be attributed, not only to the physico-chemical effect exerted by the serum proteins, according to Eagle, *but also to the reactivating action of the 4th component.*

BIBLIOGRAFIA

1 — Bier, O. — 1936 — Ueber das Verhalten der sogenannten «Komponenten» des Komplements bei der Wassermann-Reaktion. *Zeitschr. f. Immunitätsf. u. exp. Ther.*, **89**, 218-229.

2 — Cruz, J. da Costa & Penna, H. — 1932 — Constituição da alexina e mechanismo da hemolyse especifica. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, **26**, 99-123.

3 — Deissler, K. — 1932 — Zur Kenntnis der sog. Komponenten des Komplements. *Zeitschr. f. Immunitätsf. u. exp. Ther.*, **73**, 365.

4 — Eagle, H. — 1937 — Laboratory Diagnosis of Syphilis. St. Louis, C. V. Mosby Comp.

5 — Misawa, I., Ohta, T. & Imahori, H. — 1935 — Ueber das Verhalten der sogenannten «Komponenten» im Menschenserum bei der Komplementbindung. *Zeitschr. f. Immunitätsf. u. exp. Ther.*, **86**, 505-517.

Vol. 9 — Art. 12 Setembro de 1938

ESTUDOS SOBRE INFLAMAÇÃO

I - MECANISMO DO AUMENTO DE PERMEABILIDADE CAPILAR NA INFLAMAÇÃO, COM ESPECIAL REFERENCIA AO PAPEL DA HISTAMINA

POR

O. Bier & M. Rocha e Silva

Do Instituto Biologico de S. Paulo

Com 6 figuras no texto

A ocorrencia de substancias que fazem baixar a pressão arterial, em extratos aquosos e alcoolicos de numerosos orgãos, era já conhecida desde fins do seculo passado, tendo mesmo (1909) POPIELSKI, em numerosos trabalhos emitido a hipotese da identidade dessas substancias com um principio unico a que deu o nome de «vaso-dilatina». A descoberta da histamina permitiu a DALE & LAIDLAW (1910) identificar a hipotetica substancia «vaso-dilatina» á histamina, constituinte permanente da maioria dos tecidos dos mamiferos.

A partir dos trabalhos fundamentais de LEWIS & GRANT (1925-1927), a libertação de uma substancia semelhante á histamina, ou da propria histamina se verificaria sempre que um agente irritante qualquer, como o calor, o frio, acidos e alcalis, picadas de insectos, reações alergicas, etc., agisse sobre certos orgãos, muito especialmente a pele.

Por outro lado, um aumento do teôr em histamina dos liquidos organicos, em seguida a certas ações deleterias, tem sido verificado. Assim BARSOUM & GADDUM (1936) mostraram que uma queimadura da pele determina o aumento do teôr em histamina do sangue circulante. Além disso os mesmos autores tinham mostrado (1935) (2) que, em seguida á parada da circulação em cães, por ligadura de um membro inferior, o teôr em histamina do sangue venoso que sae do orgão isquemiado, era aproximadamente 4 vezes maior que o do sangue arterial.

Ultimamente, RIESSER (7) (1937) mostrou que uma inflamação produzida na pele do coelho, pela injeção de uma substancia irritante como o oleo de mostarda *(Senföl)*, determina uma elevação do teôr em histamina, na área injetada, de 2 a 5 vezes o teôr da histamina na pele normal do coelho.

Até recentemente, portanto, a explicação mais simples para o aumento de permeabilidade capilar caracteristico dos processos inflamatorios, seria encontrada na ocorrencia de dóses apreciaveis de histamina nos exsudatos inflamatorios.

Recentemente (1936), MENKIN (4, 5, 6) indicou a presença, nos exsudatos inflamatorios, de um fator capaz não sómente de aumentar a permeabilidade dos capilares a um corante como o tripan-blau, injetado na veia, como ainda de induzir o quimiotactismo positivo dos leucocitos; dahi a designação de «leucotaxina» dada ao fator descoberto.

Segundo MENKIN a distinção entre a leucotaxina e a histamina se faria em virtude das duas considerações seguintes: 1.º) A injeção intradermica de leucotaxina induz á formação de uma área homogenea azul em seguida á injeção intravenosa de azul tripan. A histamina produziria um *pattern* completamente distinto, caracterizado por uma zona branca circundada por um halo azul em torno. 2.º) Sobre o intestino isolado de cobaia, a leucotaxina seria inativa, ou produziria antes uma ligeira depressão do tonus. A histamina provocaria a reação habitual bem conhecida.

Os resultados referidos adeante, já em via de publicação no *Virchow's Archiv*, mostram com muita clareza que a existencia da leucotaxina de MENKIN não foi comprovada com documentação suficientemente substancial e indiscutivel.

Um de nós, em companhia de PLANET (1938) (3) mostrou, em extratos de pele de diferentes animais, a ocorrencia de um fator capaz de induzir um aumento de permeabilidade capilar, ao tripan-blau, quando injetado no coelho intradermicamente, sob todos os pontos comparavel ao produzido pelos exsudatos inflamatorios. Da mesma maneira que o fator de MENKIN, o fator cutaneo é termostavel e acarretado pelo precipitado de globulinas obtido pelo sulfato de amonio em meia saturação.

A mesma experiencia repetida com um extrato de pulmão forneceu resultados similares. Ora, como é sabido, a pele e o pulmão são os orgãos mais ricos em histamina. Essa coincidencia induziu-nos a pesquizar a identidade do fator de MENKIN encontravel nos exsudatos inflamatorios com a histamina, ordinariamente tambem aí encontrada em dóses apreciaveis.

PARTE EXPERIMENTAL

1. Presença, nos extratos de pele normal, de uma substancia que aumenta a permeabilidade capilar.

Extratos de pele normal de coelho, de cobaia e humana foram obtidos tomando um peso determinado de pele epilada, picando finamente com uma tesoura, triturando com areia e adicionando o dobro de peso, em volume, de agua fisiologica.

Após alguns minutos de contato (em geral, 10 a 15 minutos), centrifuga-se e quando não se obtém um sobrenadante completamente limpido, filtra-se através de um disco Seitz clarificador.

Conforme foi já comunicado por um de nós (O. B.), em colaboração com PLANET, os extratos obtidos de acôrdo com a técnica acima descrita promovem na pele do coelho o mesmo efeito referido por MENKIN com os exsudatos inflamatorios, a saber o acumulo, nas áreas cutaneas injetadas de tripan-blau injetado na veia.

Posteriores experiencias com exsudatos, reforçaram a convicção de que se trata do efeito de uma substancia comum aos extratos cutaneos e aos exsudatos.

Da mesma maneira que o fator de MENKIN, o fator cutaneo é termostavel e acarretado pelo precipitado de globulinas obtido pelo sulfato de amonio em semisaturação, como se póde vêr nos protocolos das experiencias resumidas na tabela 1.

A 50 cc. de extrato de pele de coelho adicionam-se 50 cc. de solução saturada de $(NH_4)_2\ SO_4$. Centrifuga-se; o sedimento é dissolvido em 5 cc. de agua fisiologica (concentração 10 X). Desta diluição, que contém ainda algumas particulas em suspensão, prepara-se outra diluição ao $^1/_2$ (concentração 5 X), da qual resulta uma solução perfeitamente limpida.

Para o estudo da termoresistencia do fator cutaneo foi o extrato total de pele aquecido em banho-maria fervendo durante 5, 15 e 30 minutos.

TABELA 1

Caracteristicas do fator cutaneo.

a) Protocolo da experiencia 1. Termoresistencia do fator cutaneo. Agosto 2, 1937.

Area cutanea n.º inoculada com 0,2 cc. de	Resultado observado 20 minutos após a injeção venosa de 7 cc. de tripan-blau a 10 %.
(1) Extrato de pele não aquecido	+++
(2) » » » aquecido a 100°5 min.	+++
(3) » » » » » 15 »	+++
(4) » » » » » 30 »	+++

b) Protocolo da experiencia 2. Extrato de pele e suas frações. Agosto 3, 1937.

(1) Extrato de pele total	+++
(2) Sobrenadante do precipitado de globulinas	Reação caracteristica do $(NH_4)^2\ SO_4$.
(3) Solução de globulinas, conc. 10 X . .	++++
(4) » » » , conc. 5 X . .	++++
(5) Agua fisiologica	—

A reação obtida com o extrato de pele ou suas frações ativas é absolutamente do mesmo tipo da observada por MENKIN, isto é, um acumulo homogeneo do corante ao nivel da área cutanea tratada,

o qual se esboça 2-5 minutos após a injeção venosa, atingindo o maximo de nitidez dentro de 15-20 minutos.

Com o sobrenadante do precipitado de globulinas representando uma solução concentrada de $(NH_4)^2\ SO_4$, tambem nós observamos o mesmo efeito descrito por MENKIN para esta substancia, isto é, formação de uma área central branca com uma orla periferica vermelha e acumulo do corante sob a fórma de um halo na periferia da lesão cutanea.

2. Comparação dos efeitos da histamina e dos exsudatos inflamatorios em relação ao acumulo de tripan-blau do sangue circulante nas áreas cutaneas tratadas.

Estudos comparativos cuidadosos foram feitos com extratos de pele, exsudatos inflamatorios e soluções de histamina, em varias concentrações, em relação á capacidade de promover o acumulo de tripan-blau da circulação do coelho nas áreas cutaneas injetadas.

Os resultados obtidos estão consignados na tabela 2, que resume os protocolos de algumas experiencias nitidas.

Exsudatos inflamatorios foram obtidos no cão mediante a injeção intrapleural de essencia de terebintina. O exsudato I provém de um animal que recebeu 2 cc. de terebintina na pleura, e 3 dias depois, mais 4 cc.; esse animal morreu espontaneamente um dia após a segunda inoculação e forneceu quantidade abundante (cêrca de 500 cc.) de um exsudato sôro-fibrinoso.

O exsudato II foi retirado de um cão injetado com 2 cc. de essencia de terebintina e sacrificado 24 horas depois.

A histamina foi dissolvida a 0,2 % em agua fisiologica e daí fizeram-se as diluições empregadas nas diversas experiencias.

TABELA 2

Comparação dos efeitos dos exsudatos inflamatorios, dos extratos de pele e de soluções de histamina em relação ao acumulo de tripan-blau.

Area cutanea n.º inoculada com 0,2 cc. de	Reação observada após injeção venosa de 6-7 cc. de sol. tripan-blau a 10 %.	
	5 minutos	20 minutos
I) Coelho C		
(1) Histamina 1/500	—	—
(2) » 1/5.000.	+++	+++
(3) » 1/50.000	+++	+++
(4) » 1/500.000.	+++	+++
(5) Extrato de pele 1:1	++	++
(6) » » » 1:10	+++	+++
(7) » » » 1:20	—	—
(8) » » » 1:40	—	—
(9) Agua fisiologica	—	—

Area cutanea n.º inoculada com 0,2 cc. de	Reação observada após injeção venosa de 6-7 cc. de sol. tripan-blau a 10 %.	
	5 minutos	20 minutos
II) Coelho E		
(1) Histamina 1/500	—	—
(2) » 1/5.000.	—	—
(3) » 1/50.000	++	+++
(4) » 1/500.000.	+++	+++
(5) » 1/500.000.000	—	—
(6) Extrato de pele 1:1	++	+++
(7) » » » 1:10.	++	+++
(8) » » » 1:20.	++	+++
(9) » » » 1:40.	+	+++
(10) Exsudato I	++ com área central branca	+++ com área central branca
(11) Agua fisiologica	—	—
III) Coelho G		
(1) Histamina 1/400.000.	+++	+++
(2) » 1/4.000.000	—	—
(3) » 1/40.000.000.	—	—
(4) Exsudato I 1:1.	+++ com uma pequena área central branca	++++ com pequena área central branca
(5) » 1:10	+++	++++
(6) » 1:100.	+	+
(7) Agua fisiologica	—	—
IV) Coelho P		
(1) Histamina 1/500	—	—
(2) » 1/5.000	++++	++++
(3) » 1/50.000	+++	+++
(4) Exsudato I 1:1.	+++ com uma pequena área central branca	++ com pequena área central branca
(5) » 1:10	++	++
(6) » 1:100.	—	±
(7) Agua fisiologica	—	—
V) Coelho R		
(1) Histamina 1/5.000.	—	—
(2) » 1/50.000	+++	+++
(3) Extracto do exsudato I (1/20.000 a 1/50.000)	+++ com uma pequena área central branca	+++
(4) Exsudato I 1:1.	+++ com uma pequena área central branca	+++
(5) » 1:10	++	++
(6) » 1:100.	+	—
(7) Exsudato II 1:1.	+++	+++
(8) » 1:10	—	—
(9) » 1:100.	—	—

(1) As reações observadas com soluções de histamina a 1/500 e, por vezes, a 1/5.000 são consignadas como — , por não consistirem num acumulo homogeneo do corante. O tipo de reação observado nestes casos é descrito no texto.

Para a interpretação dos resultados referidos na tabela 2, alguns esclarecimentos complementares são necessarios.

A histamina, em fortes concentrações, a 1/500 e, por vezes mesmo a 1/5.000, não determina acumulo homogeneo do tripan-blau, porém determina o aparecimento de uma lesão caracteristica: área central branca circundada de um halo periferico azul, mais ou menos difuso.

Em concentrações maiores, entretanto (1/5.000, dependendo da reação individual do coelho) as soluções de histamina injetadas intracutaneamente determinam um acumulo homogeneo do corante.

Ha, todavia, uma diferença entre a reação provocada pelas soluções puras de histamina, de um lado, e a produzida pelos exsudatos e pelos extratos de pele, de outro. O corante que se acumula ao nivel da lesão cutanea produzida pela histamina difunde-se através de uma área mais extensa, que, por esse motivo, adquire uma coloração azul mais palida que a observada ao nivel das áreas injetadas com o exsudato ou o extrato cutaneo.

E' de notar tambem que com o exsudato I, que, como se verá adiante, é mais rico em histamina, se obtem reação cutanea em mais forte diluição (1/10) do que com o exsudato II (1:1).

Particularmente digno de menção é o fato verificado no coelho R, de que tanto o exsudato I, como o extrato do exsudato I obtido mediante a técnica de BARSOUM e GADDUM para a extração da histamina, produziram o mesmo tipo de reação cutanea: pequena área central clara circundada de um largo halo azul.

3. Equivalente histaminico dos exsudatos inflamatorios. Ocorrencia de substancias depressoras que mascaram o efeito da histamina sobre o intestino isolado.

A determinação do teôr em histamina nos exsudatos I e II foi feita pelo metodo, descrito primeiramente por GUGGENHEIM & LÖFFLER (1936) no intestino delgado de cobaia. Um fragmento de 3 a 5 cc. de extensão do intestino era mantido em Ringer a 37° durante 10 min. para que a evacuação do conteúdo por ventura existente, se fizesse espontanea e completamente.

O fragmento do intestino era então lavado em novo Ringer e fixado no aparelho de Dale, em banho de Ringer de 40 cc. de capacidade, e mantido á temperatura de 38°. A disposição do aparelho era aproximadamente a descrita por RIESSER (1937).

O intestino era, inicialmente e com intervalos de 5 minutos, submetido a quantidades medidas de uma solução de prova (1/400.000

ou 1/500.000) de histamina. Ao fim de 15 a 20 minutos as contrações eram, geralmente, bastante regulares, tendo inicio então a determinação do equivalente histaminico do exsudato ou do extrato deste ultimo.

Esse extrato era obtido pelo metodo de Barsoum & Gaddum (1). Dez cc. do exsudato eram tratados com 15 cc. de uma solução a 15 % de acido tricloracetico. Depois de 1 a 2 horas de agitação, a mistura era então filtrada e o papel de filtro cuidadosamente lavado com a solução de acido tricloracetico. Os filtrados reunidos eram libertados do acido tricloracetico, por agitação constante em funil de decantação, com éter.

O liquido assim obtido era então fervido com 4 cc. de HCl normal, durante 2 horas, e em seguida levado á secagem, no vacuo. O residuo era em seguida extraído com alcool a quente, saturado de NaCl, uma ou duaz vezes. O extrato assim obtido depois de filtrado e cuidadosa lavagem do filtro com novo alcool, era então levado á secagem em banho-maria em ebulição. O residuo era finalmente extraído com Ringer durante 24 horas na geladeira. Depois da filtração obtinha-se um extrato limpido que era utilizado na determinação do teôr real da histamina do exsudato.

Este valor, para o primeiro exsudato, era de cerca de 1/20.000 e para o segundo exsudato, de 1/50.000.

Resultados: Não pudemos observar a ação depressora sobre o tonus do musculo liso do intestino de cobaias, exercida pelos exsudatos estudados, e de acôrdo com os resultados descritos por Menkin (1936).

Mesmo em natureza, o exsudato I, mostrou-se capaz de produzir forte contração do intestino delgado de cobaia (fig. 1).

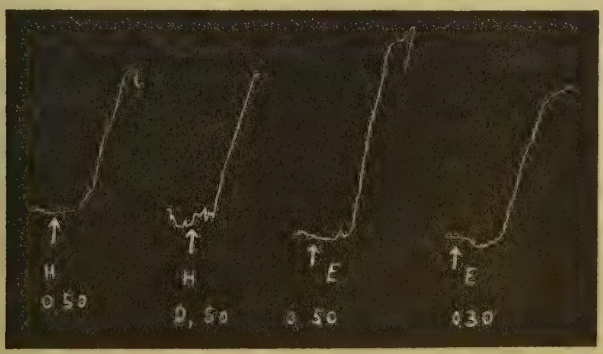


Fig. 1 — H = sol. Histamina 1/400.000. E = exsudato em natureza.

Quando tentamos, entretanto, determinar com exatidão o seu teôr em histamina, encontramos dificuldades que permitiram esclare-

recer um ponto muito importante. Uma diluição de 20 vezes, do exsudato, determinava uma reação fraca do musculo liso, muito menor do que a reação produzida por uma solução 1/800.000 de histamina (fig. 2). Ora, o extrato do mesmo exsudato, preparado com a técnica morosa de BARSOUM & GADDUM, com a qual seria de esperar ainda uma perda do conteúdo histaminico, dosou ao contrario uma quantidade de histamina bem maior que o proprio exsudato de origem (fig. 3).

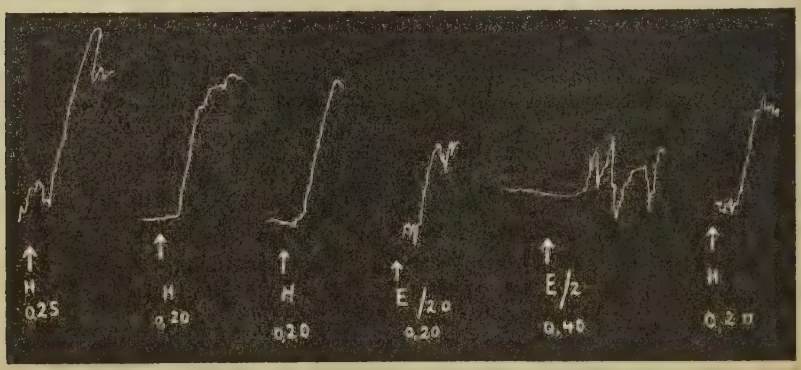


Fig. 2 — H = sol. Histamina 1/800.000. E = exsudato I em natureza. Póde-se notar ainda o efeito irregular produzido pela diluição 1/2 do exsudato.

Os resultados indicados nas figs. 1 a 3 mostram claramente que, substancias depressoras, afastadas pelo metodo de extração descrito acima, interferem com a histamina na sua ação sobre o musculo liso.

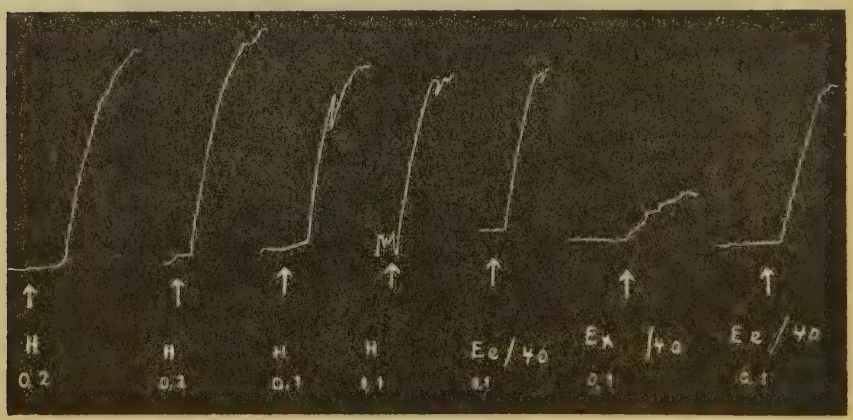


Fig. 3 — H = sol. Histamina 1/800.000. E $e/_{40}$ = extrato do exsudato diluido 40 vezes. E $x/_{40}$ = exsudato em natureza diluido 40 vezes.

Esse fato foi ainda nitidamente verificado com o exsudato II e o seu respetivo extrato. Ao passo que o exsudato em natureza produzia em dose forte, uma reação bastante fraca, o extrato do exsudato, diluido 10 vezes, produzia uma reação forte e nitidamente similar á da histamina (figs. 4 e 5).

Fig. 4 — H = sol. Histamina 1/400.000. E_2 = segundo exsudato, em natureza. E_2 + sôro = exsudato II diluido a 1/5 com sôro normal de cavalo.

A figura 4 mostra ainda que a adição de certa quantidade de exsudato em natureza, ao banho de Ringer em que está suspenso o fragmento de intestino, determina o aparecimento de uma fase refratária, durante a qual o intestino reage mal a doses de histamina, equivalentes áquelas com as quais reagia ótimamente, no começo da experiencia.

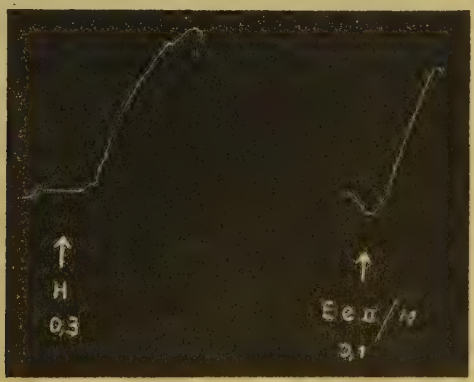


Fig. 5 — H = sol. Histamina 1/500.000. E e II/10 = Extrato do exsudato II, diluido 10 vezes.

Para explicar esse fato podia-se admitir uma impregnação, pelo intestino, daquelas substancias depressoras encontradas no exsudato em natureza. A suposição de que a propria histamina do exsudato fosse a causa daquele estado refratario, o que poderia ser aproximado dos resultados obtidos por BARSOUM & GADDUM (2) que observam uma fase refrataria á histamina, de fragmentos de intestino previamente tratados com doses fortes de histamina, exigiria experiencias complementares.

Mas de qualquer maneira esse fato está em oposição com os resultados de MENKIN, que não pôde observar nenhuma fase refrataria em relação á histamina, em seguida á adição de um dialisado de um exsudato inflamatorio, ao banho de Ringer, contendo o intestino de cobaia.

Em resumo, o exsudato de cão, obtido pela injeção prévia de essencia de terebintina na pleura, possúe um teôr em histamina bastante elevado (entre 1/20.000 e 1/50.000) cujo efeito sobre a musculatura lisa póde ser mascarado por substancias depressoras de natureza não determinada e que pódem ser afastadas com o metodo de extração descrito por BARSOUM & GADDUM.

Como é sabido, este ultimo metodo é igualmente capaz de afastar outras substancias tais como a acetil-colina, colina, bem como os sáis de potassio (segundo MENKIN (4) em quantidade sempre muito aumentada, nos exsudatos inflamatorios).

Assim os efeitos obtidos com os extratos dos exsudatos I e II, não só em relação ao acumulo de tripan-blau na zona da injeção intradermica, como tambem sobre o intestino delgado de cobaia, pódem ser atribuidos a uma solução (entre 1/20.000 e 1/50.000) purificada, de histamina.

Presença de substancias semelhantes á histamina, no precipitado de globulinas do exsudato I, obtido em $^1/_2$ saturação de $(NH_4)_2\ SO_4$.

Como foi mostrado, as globulinas precipitadas pelo sulfato de amonio em $^1/_2$ saturação, encerram em dose apreciavel a chamada leucotaxina de MENKIN (1937). Da mesma forma, o fator cutaneo que aumenta a permeabilidade capilar (BIER e PLANET, 1937) é acarretado pelo sulfato de amonio em $^1/_2$ saturação.

Fizemos uma experiencia para verificar a presença de substancias semelhantes á histamina *(histamine-like)*, no precipitado obtido tratando-se o exsudato I, com o sulfato de amonio em $^1/_2$ saturação. O

precipitado de globulinas, assim obtido, redissolvido em agua fisiologica, excita fortemente a musculatura lisa do intestino de cobaia, mostrando elevado teôr em substancias semelhantes á histamina (fig. 6).

Fig. 6 — Precipitado de globulinas, obtido com o $(NH_4)_2 SO_4$ 1/2 saturado. Ação sobre a musculatura lisa do intestino, de diversas diluições da solução do precipitado de globulinas em agua fisiologica.

DISCUSSÃO

As experiencias referidas neste trabalho, em desacôrdo com as observações de MENKIN, consubstanciam a hipotese emitida por LEWIS e coll. de que a histamina ou uma substancia muito proxima (substancia H) seja o fator responsavel pelo aumento de permeabilidade capilar que se verifica ao nivel dos fócos inflamatorios.

Dois fatos fundamentais falam em favor dessa conclusão:

1) As soluções puras de histamina, em concentração adequada (1/5.000 a 1/500.000) segundo a resposta individual dos coelhos, produzem o mesmo acumulo homogeneo de corante observado por MENKIN nas áreas cutaneas injetadas com exsudatos inflamatorios. A unica diferença observada, a saber, a formação de áreas mais extensas e coradas em azul palido com as soluções de histamina, em contraste com as áreas limitadas e intensamente azues que se obtêm não só com os exsudatos, como tambem com os extratos de pele, póde ser explicada pela maior difusibilidade da histamina em solução pura. Nas experiencias com exsudatos e extratos de pele, a difusão da histamina é diminuida presumidamente pela combinação frouxa com proteinas ou pela adsorção sobre certos coloides.

2) Os exsudatos inflamatorios possúem um equivalente histaminico que corresponde sensivelmente á concentração de histamina adequada para produzir o acumulo de corante nas áreas cutaneas tratadas.

Os resultados negativos de MENKIN quanto á presença de histamina nos exsudatos inflamatorios podem ser talvez atribuidos á presença de substancias de efeito depressor que, em certas condições de técnica, pódem talvez mascarar completamente o efeito caracteristico da histamina sobre a musculatura lisa.

Com efeito, tratando-se aqueles exsudatos pelo processo usado por BARSOUM & GADDUM para a extração da histamina, processo que ao mesmo tempo afasta outras substancias tais como a acetilcolina, a colina, bem como sáis de potassio (segundo MENKIN, em quantidade sempre muito aumentada nos exsudatos e talvez não extranhos ao seu «fator»), obtêm-se extratos de alto equivalente histaminico (1/20.000 a 1/50.000), capazes de produzirem o acumulo homogeneo de tripan-blau, quando injetados na derme do coelho.

Ora, o metodo descrito por MENKIN, para a purificação de seu fator não exclue a possibilidade da contaminação dos seus cristais, não só com pequenas doses de histamina, responsaveis pela ação sobre os capilares, mas tambem de substancias depressoras que competem com a histamina na sua ação sobre a musculatura lisa do intestino isolado. De fato, BARSOUM & GADDUM (1) mostraram que a destruição de tais substancias depressoras só é obtida depois de 45′ a 90′ de ebulição com HCl normal, e CODE (1937) aconselha mesmo o uso de HCl concentrado. Ora, o metodo usado por MENKIN não inclue nenhuma fase em que essa precaução seja tomada. Isso explicaria, talvez, o efeito negativo obtido por ele, em seguida á adição dos seus cristais ao banho de Ringer, contendo o intestino isolado de cobaia.

O conjunto desses fatos torna completamente superflua a consideração de um novo fator — a leucotaxina, para explicar as perturbações da circulação e da troca de liquidos que se dão ao nivel dos fócos inflamatorios. Recentemente MENKIN refere que o fator especifico dos exsudatos inflamatorios é capaz de promover tambem a migração leucocitaria e, por isso, denomina-o leucotaxina.

A esse efeito quimiotactico em relação aos leucocitos faremos referencia em trabalho posterior.

CONCLUSÕES

1. Concentrações adequadas de soluções puras de histamina produzem na pele do coelho efeito comparavel (acumulo de tripan-blau da corrente circulatoria) ao descrito por MENKIN com os exsudatos inflamatorios.

2. Em contradição com os resultados experimentais de MENKIN, os exsudatos inflamatorios exercem sobre o intestino isolado da cobaia o mesmo efeito caracteristico da histamina — O equivalente hista-

minico dos exsudatos deve ser determinado em extratos purificados, afim de afastar substancias depressoras, que mascaram o efeito da histamina.

3. Daí decorre que os efeitos atribuidos por MENKIN á leucotaxina, podem ser explicados, de acôrdo com a teoria de LEWIS, pela libertação de um *tissue-hormone* pelas celulas lesadas, o qual apresenta as mesmas propriedades da histamina ou da muito proxima substancia H.

Agradecemos a colaboração do Dr. J. M. FREITAS, que injetou os cães e recolheu os exsudatos.

STUDIES ON INFLAMMATION.

I. MECHANISM OF INCREASED CAPILLARY PERMEABILITY IN INFLAMMATION, WITH SPECIAL REFERENCE TO THE ROLE OF HISTAMINE.

Abstract

The evidences brought forward in this paper substantiate LEWIS'S *theory of histamine or its closely related H Substance as the primary cause of the increase in capillary permeability in Inflammation.*

This is indicated by two fundamental facts:

I) Proper concentrations of pure solutions of histamine (1:5000 to 1:500,000) induce an increased permeability of the capillaries of the rabbit, as demonstrated by the homogeneous accumulation of tripan-blue from the circulating blood into treated cutaneous areas. The staining is the same as observed by MENKIN *with inflammatory exudates. The sole difference is the more widespread and correspondingly less colored skin areas obtained with the pure solutions of histamine, in contrast to the more limited staining observed in the cutaneous areas treated with the inflammatory exudates* (MENKIN, *1936) or the skin extracts* (BIER & PLANET, *1938). Both in the exudates and in the skin extracts, the diffusion of the histamine is presumably prevented by loose combination with proteins or by adsorption of colloids.*

II) In contradiction to the experimental results of MENKIN, *the inflammatory exudates induce on the isolated guinea-pig intestine the same characteristic effect of histamine. As a matter of fact the «histamine equivalent» of the exudates corresponds approximately to the concentration of histamine capable of producing the accumulation of dye in the treated cutaneous areas.*

The negative results of MENKIN *are perhaps referable to the existence of depressing substances which, in particular technical conditions, may completely obscure the characteristic effect of histamine on the smooth muscle. For the purpose of determining the «histamine*

equivalent» of the inflammatory exudates, it is necessary to work with purified extracts (BARSOUM & GADDUM'S *method), in order to eliminate these depressing substances.*

The study of the facts here presented makes it unnecessary to postulate a new factor (leucotaxine) to explain the disturbances in local fluid exchange that takes place in the inflammed areas.

BIBLIOGRAFIA

1 — BARSOUM, G. S. & GADDUM, J. H. — 1935 — Pharmacological estimation of adenosin and histamine. *Journ. of Physiol.,* **85**, 1-14.

2 — BARSOUM, G. S. & GADDUM, J. H. — 1935 — The liberation of Histamine during reactive hyperaemie. *Journ. of Physiol.,* **85**, 13 P.

3 — BIER, O. & PLANET, N. — 1938 — *Compt. rend. Soc. biol.,* (em curso de publicação.)

4 — MENKIN, V. — 1936 — Studies on Inflammation. *J. exp. med.,* **64**, 485-502.

5 — MENKIN, V. — 1937 — Isolation and properties of the factor responsible for increased capillary Permeability in Inflammation. *Proc. Soc. exp. biol. med.,* **36**, 164-167.

6 — MENKIN, V. — 1938 — Studies on Inflammation. XIV and XV. *Journ. exp. med.,* **67**, 129 and 145.

7 — RIESSER, O. — 1937 — Histaminstudien. *Arch. f. exp. Pathol. u. Pharmakol.,* **187**, 1-21.

———o———

Vol. 9 — Art. 13 Setembro de 1938

ESTUDOS SOBRE INFLAMAÇÃO

II - EXPERIENCIAS ADICIONAIS SOBRE A IDENTIDADE DA LEUCOTAXINA DE MENKIN E DA HISTAMINA

POR

M. Rocha e Silva & O. Bier

Do Instituto Biologico de S. Paulo

Com 6 figuras no texto

Em um trabalho anterior (2), mostrámos que a histamina ou a substancia H de Lewis deve ser a causa primaria do aumento de permeabilidade capilar induzido pelos exsudatos inflamatorios.

Pesquisas complementares apresentadas neste trabalho corroboram fortemente a identificação entre a histamina e a leucotaxina de Menkin.

PARTE EXPERIMENTAL

O metodo usado para a dosagem da histamina foi o mesmo empregado em trabalho precedente (2). Para o preparo de extratos do exsudato, livres de histamina, usamos a técnica indicada por Barsoum & Gaddum (1): o exsudato é tratado com acido tricloracetico da mesma maneira que para a extração da histamina; depois de eliminar o acido tricloracetico pelo éter, o extrato é fervido com soda (1 cc. NaOH N/1 para 5 cc. de extrato) durante 15 minutos e finalmente neutralizado.

1. Experiencias com o exsudato pleural humano.

Como verificámos no trabalho anterior (2), os exsudatos inflamatorios obtidos em cães mediante a injeção intrapleural de essencia de terebintina contém substancias depressoras, que interferem com o efeito da histamina sobre o intestino isolado de cobaia.

Referiremos a seguir uma série de experiencias com um exsudato pleural proveniente de um caso de carcinoma do pulmão. Como se vê na fig. 1, a adição ao banho de Ringer contendo o musculo intestinal, de uma diluição a 1/10 do exsudato não tratado, é incapaz de provocar qualquer contração nitida, produzindo sómente oscilações pequenas e irregulares, sem modificação apreciavel do tonus. Todavia, o extrato, obtido do mesmo exsudato, pela técnica de Barsoum & Gaddum para a extração da histamina, produziu uma forte contração comparavel á provocada por uma solução pura de histamina (fig. 1-b).

O exsudato não tratado, quando experimentado sem diluição, mostrou um equivalente histaminico de 1/500.000 (fig. 2), enquanto o extrato do exsudato (fig. 1-b) exibiu um equivalente histaminico de 1/50.000, aproximadamente.

Esses fatos, mostram com toda evidencia que no exsudato não tratado, existem substancias depressoras que mascaram a ação da histamina sobre o musculo liso.

O mesmo exsudato humano, bem como o seu extrato, foram verificados em relação á capacidade de provocar o acumulo de azul

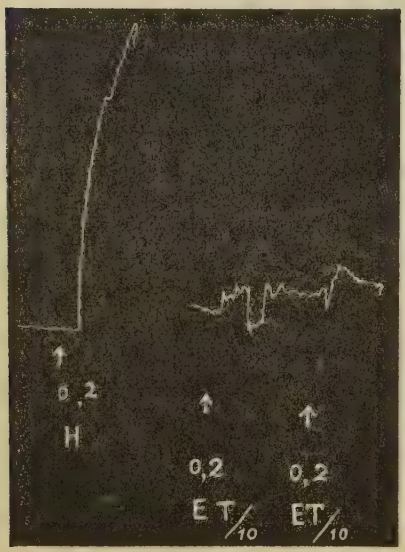


Fig. 1 a — Ação do exsudato pleural humano diluido a 1/10 sobre o intestino isolado de cobaia. H = histamina 1/500.000. ET/10 = exsudato humano diluido a 1/10.

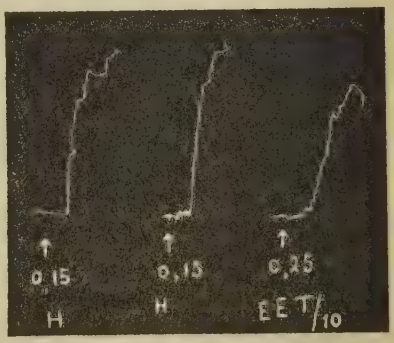


Fig. 1 b — Ação do extrato do mesmo exsudato obtido pelo metodo de BARSOUM & GADDUM. H = histamina 1/250.000. EET/10 = extrato diluido a 1/10. Notar que o efeito produzido por 0,15 de histamina 1/250.000 corresponde aproximadamente ao produzido por 0,3 de exsudato a 1/10: equivalente histaminico do exsudato = 1/50.000.

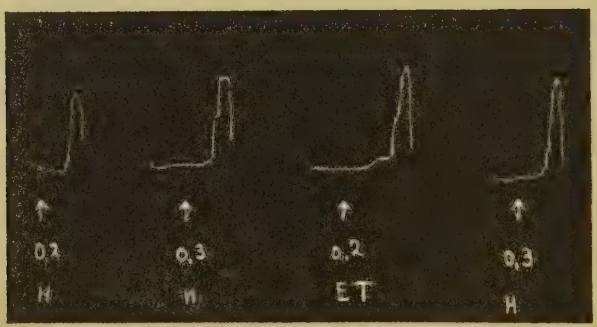


Fig. 2 — Determinação do equivalente histaminico do exsudato humano. H = histamina a 1/500.000. ET = exsudato humano não diluido. Equivalente histaminico do exsudato = 1/500.000.

tripan na pele do coelho, de acôrdo com o test empregado por MENKIN. Os resultados estão resumidos na tab. 1. O acumulo do corante obtido com o exsudato não tratado foi absolutamente identico ao descrito por MENKIN, como caracteristico da histamina. E' de notar que o extrato do exsudato induz o mesmo acumulo de corante, embora não de modo tão caracteristico como o exsudato em natureza. Este ultimo produziu uma larga zona central descorada, envolvida por um halo azul, enquanto o extrato obtido pelo metodo de BARSOUM & GADDUM produziu sómente uma pequena zona central branca, cercada por largo halo de corante, homogeneamente acumulado.

TABELA 1

Protocolo do coelho 1714. Atividade do exsudato humano T e do seu extrato histaminico em relação ao aumento de permeabilidade capilar

Área cutanea n.o Injetada com 0,2 cc.	7 cc. 1% azul de tripan em agua fisiologica, na veia. Presença do corante na área tratada após	
	10 minutos	30 minutos
1. Extrato	+++ (pequena área central branca)	+++
2. Extrato	+++ (pequena área central branca)	+++
3. Exsudato em natureza . . .	++ (grande área central branca)	++
4. Exsudato em natureza . . .	++ (grande área central branca)	++

O numero de cruzes indica a intensidade da coloração azul.

2. Experiencias com um exsudato de cão obtido pela injeção intrapleural de terebintina. A histamina deste exsudato foi eliminada mediante a hidrolise alcalina.

Extratos livres de histamina de um exsudato pleural de cão (exsudato II) foram preparados por meio da hidrolise alcalina, de acôrdo com a técnica citada de BARSOUM & GADDUM (1). O exsudato original tinha um alto equivalente histaminico (fig. 3), enquanto um extrato obtido deste exsudato por meio da hidrolise alcalina era completamente inativo (fig. 4).

Com este extrato livre de histamina foram feitas as seguintes experiencias, afim de verificar:

1) Si o extrato livre de histamina, do exsudato era capaz de obscurecer o efeito da histamina sobre o intestino isolado;

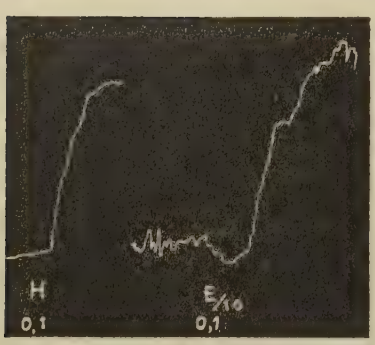


Fig. 3 — A ação do exsudato II sobre o intestino isolado de cobaia. H = histamina a 1/500.000. E/10 = Exsudato a 1/10.

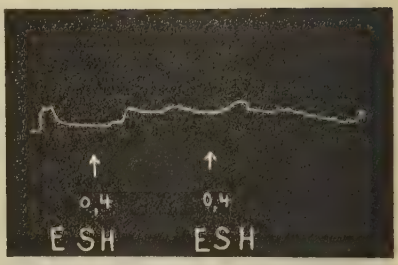


Fig. 4 — Inatividade do extrato livre de histamina, do exsudato II.

2) A capacidade de produzir o aumento de permeabilidade capilar na pele do coelho.

Como mostra a fig. 5 a adição de partes iguais do extrato livre de histamina, a uma solução conhecida de histamina (1/250.000), resulta em uma definida neutralização do efeito caracteristico da histamina sobre o intestino isolado.

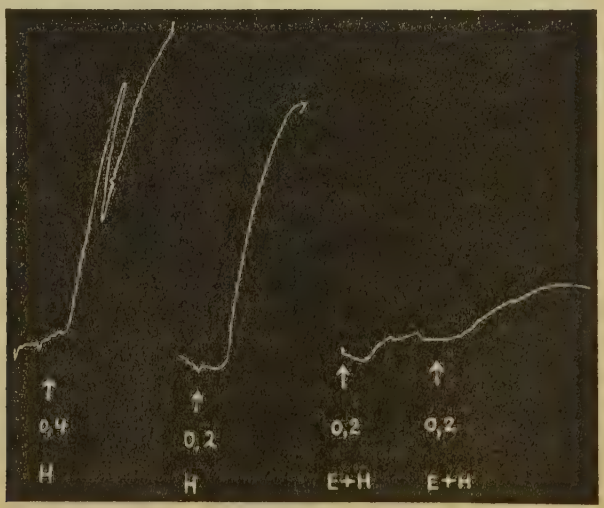


Fig. 5 — Neutralização da histamina pelo extrato livre de histamina, do exsudato II. H = histamina 1/500.000. E + H = mistura de partes iguais de histamina e do extrato do exsudato, tratado pela hidrolise alcalina.

Os dados resumidos na tab. 2 indicam que o extrato livre de histamina perdeu ao mesmo tempo a capacidade de provocar o acumulo de azul tripan do sangue, nas áreas cutaneas tratadas.

TABELA 2

Protocolo do coelho n.º 1.714. Inatividade do extrato livre de histamina (hidrolise alcalina) do exsudato n.º 2.

Area cutanea n.º Injetada com 0,2 cc.	7 cc. 1% azul de tripan em agua fisiologica, na veia. Presença do corante na área tratada após	
	10 minutos	20 minutos
1. Extrato livre de histamina diluido a 1/3	—	—
2. » » » » » » »	—	—
3. Exsudato em natureza diluido a 1/3. .	+++	+++
4. » » » » » » . .	+++	+++

DISCUSSÃO

Os fatos experimentais referidos neste e no precedente trabalho apoiam fortemente a idéa da identidade entre o fator de permeabilidade existente nos exsudatos e a histamina. Efetivamente, a analise comparativa de algumas das mais caracteristicas propriedades da leucotaxina de MENKIN e da histamina não revela diferenças essenciais, como se póde vêr na tab. 3.

TABELA 3

Quadro comparativo de algumas propriedades caracteristicas da leucotaxina e da histamina.

Propriedades	Fator de permeabilidade	Histamina
Acumulo de azul tripan.	+ (Por vezes uma larga área central branca)	+ (Área central branca ou acumulo homogeneo, segundo a concentração)
Termoresistencia . .	+	+
Dialise	+	+
Precipitação por 1/2 sat. de sulfato de amonio	+	+
Precipitação por acido tricloracetico . . .	—	—
Solubilidade em alcool	+	+
Cristais de picrato . .	+	+
Destruição por HCl Concentrado . . .	+	+
Destruição por hidrolise alcalina . . .	+	+

Uma propriedade adicional importante do fator de permeabilidade foi mais recentemente assinalada por MENKIN (6), a saber, a de induzir migração leucocitaria. Este fator quimiotactico será objeto de um trabalho a parte.

STUDIES ON INFLAMMATION.

II - CORROBORATIVE EXPERIMENTS ON THE IDENTITY OF MENKIN'S LEUCOTAXINE AND HISTAMINE.

Abstract

1. Inflammatory exudates, the histamine of which has been eliminated by alcaline hydrolysis, lack the capacity of inducing increased capillary permeability when injected into the rabbit skin.

2. The exudates contain depressing substances which may completely obscure the action of histamine on the intestinal muscle. The addition to a known amount of histamine of equal parts of a histamine-free extract of the exudate results in a definite neutralization of the contractile effect of histamine.

3. The comparison of some of the more characteristic proporties of the permeability factor of the exudates (MENKIN'S *leucotaxine) and histamine strongly suggests the identity of both substances.*

BIBLIOGRAFIA

1 — BARSOUM, G. S. & GADDUM, J. H. — 1935 — Pharmacological estimation of adenosine and histamine. *Journ. Physiol.*, **85**, 1-14.

2 — BIER, O. & ROCHA E SILVA, M. — 1938 — Estudos sobre inflamação. I. Mecanismo do aumento de permeabilidade capilar na inflamação, com especial referencia ao papel da histamina. *Arq. Inst. Biol.*, **9**, 109-122.

3 — MENKIN, V. — 1936 — Studies on inflammation. *Journ. exp. med.*, **64**, 485-502.

4 — MENKIN, V. — 1937 — Mechanism of inflammation. *Arch. of Path.*, **24**, 65-82.

5 — MENKIN, V. — 1938 — Studies on inflammation XIV. *Journ. exp. med.*, **67**, 129-144.

6 — MENKIN, V. — 1938 — Studies on inflammation XV. *Journ. exp. med.*, **67**, 145-152.

Vol. 9 — Art. 14 Outubro de 1938

ESTUDOS SOBRE INFLAMAÇÃO

III - DO FACTOR RESPONSAVEL PELO QUIMIOTACTISMO POSITIVO DOS LEUCOCITOS, PRESENTE NOS EXSUDATOS INFLAMATORIOS

POR

M. Rocha e Silva & O. Bier

Do Instituto Biologico de S. Paulo

Em trabalho antigo MASSART & BORDET (1891) admitiram que a migração leucocitaria numa área inflamada é condicionada ao mesmo tempo pela hiperemia e pelo quimiotactismo positivo dos leucocitos. Recentemente MENKIN (1937) atribuiu a uma unica substancia, cristalina e nitrogenada, a capacidade de reproduzir experimentalmente, quando injetada intradermicamente, as sequencias basicas da reação inflamatoria, isto é, o aumento da permeabilidade capilar, seguido da migração de leucocitos polimorfo-nucleares, através da parede do capilar.

Nos trabalhos anteriores (1, 2) apresentámos observações que indicam que a histamina deve ser a causa primaria do aumento da permeabilidade capilar na inflamação. As experiencias referidas abaixo foram feitas com o objetivo de decidir:

1.º) Se a histamina, por si mesma, exerce alguma influencia quimiotactica sobre os leucocitos;

2.º) Se o fator quimiotactico dos exsudatos inflamatorios tem alguma relação com o fator que aumenta a permeabilidade capilar, presente nos exsudatos inflamatorios.

PARTE EXPERIMENTAL

Foi empregado o mesmo exsudato, obtido pela injeção intrapleural de terebintina em cão, como foi descrito anteriormente (1) (exsudato II). Empregámos desse exsudato ainda um extrato, preparado por hidrolise alcalina, de maneira a inativar a histamina nele contida, como foi descrito no trabalho anterior (2).

A histamina foi experimentada em solução em agua fisiologica, na diluição 1/25.000. O exsudato em natureza era empregado, depois de forte centrifugação, na diluição a 1:3, em agua fisiologica.

A técnica usada para observar o quimiotactismo foi essencialmente a mesma descrita por MASSART & BORDET e tambem empregada por MENKIN (3): tubos capilares de vidro, de diferentes côres, fechados numa das extremidades e cheios das diferentes substancias a serem experimentadas, eram introduzidos na cavidade peritoneal de coelhos previamente preparados pela injeção intraperitoneal, 8 horas antes, de uma suspensão, em agua fisiologica, de amilo e aleuronato. No dia seguinte os animais eram sacrificados e os tubos capilares examinados ao microscopio, com fraco aumento.

1. A histamina não tem influencia quimiotactica positiva sobre os leucocitos.

Uma primeira série de experiencias foi realizada com a histamina diluida a 1/25.000 e com o exsudato livre de celulas, diluido a 1:3. Os resultados estão descritos sumariamente na tabela 1. O numero de sinais +, refere-se á quantidade de leucocitos encontrados dentro dos tubos capilares: +++, significa uma completa obstrução dos capilares por uma rolha de leucocitos; ++, significa a presença de aglomerados compactos de leucocitos na abertura do tubo capilar, mas não obstrução completa; +, significa a presença de muitos leucocitos no interior do tubo, aderentes á parede, permanecendo a luz do capilar, livre; —, pequena quantidade de leucocitos aderentes á parede interna do capilar.

TABELA 1

Protocolo do coelho n.º 1331. Fevereiro, 14, 1938. Injetado na cavidade peritoneal ás 8,30 da manhã com 0,25 g. de aleuronato + 0,25 g. de amilo, em suspensão em 2 cc. de agua fisiologica. A's 4 horas os tubos capilares eram introduzidos, sob anestesia pelo éter, na cavidade peritoneal. O animal foi sacrificado no dia seguinte, ás 9 horas da manhã.

N.º de tubos	Côr dos tubos	Conteúdo dos tubos	Quantidade de leucocitos
6	azul	histamina (1/25.000) . . .	— ou +
6	amarelo	exsudato em natureza (1:3)	+++
6	incolor	agua fisiol.	— ou +

Como se póde ver na tabela 1, a histamina diluida a 1/25.000 é praticamente destituida de qualquer atividade quimiotactica para os leucocitos. Ao contrario, o exsudato inflamatorio, em diluição 1:3, exerce uma atração apreciavel sobre os leucocitos.

2. O aumento de permeabilidade capilar e o quimiotactismo positivo dos leucocitos, produzido pelos exsudatos inflamatorios, não podem ser atribuidos á mesma substancia.

Como foi demonstrado no trabalho anterior (2), os exsudatos inflamatorios submetidos á hidrolise alcalina, de maneira a eliminar a histamina, são incapazes de determinar o acumulo local do corante quando experimentados pela técnica de MENKIN (injeção intradermica no coelho, e injeção intravenosa de uma solução a 1 % de azul tripan). Procuramos verificar se o exsudato assim tratado (livre de his-

tamina) era ainda capaz de exercer alguma influencia quimiotactica sobre os leucocitos (tabela 2).

TABELA 2

Protocolo do coelho n.º 1333. Fevereiro, 17, 1938. Injetado na cavidade peritoneal ás 11 da manhã com 0,15 g. de aleuronato + 0,15 g. de amilo em suspensão em 3 cc. de agua fisiologica. Ás 6 da tarde os tubos capilares foram introduzidos no peritoneo sob anestesia pelo éter. O animal era sacrificado no dia seguinte ás 10 horas da manhã.

N.º de tubos	Côr dos tubos	Conteúdo dos tubos	Quantidade de leucocitos
6	azul	exsudato em natureza (1:3)	+++
6	amarelo	agua fisiol.	— ou +
6	incolor	extrato livre de histamina do exsudato (1:3) . . .	++ ou —++

Estas observações indicam que o exsudato inflamatorio, livre de histamina, embora destituido da sua capacidade de aumentar a permeabilidade capilar, conserva entretanto seu poder de atração sobre os leucocitos.

SUMARIO E CONCLUSÕES

Os exsudatos inflamatorios contêm 2 fatores, um, responsavel pelo aumento de permeabilidade e outro, pelo quimiotactismo positivo dos leucocitos. MENKIN não pôde dissociar esses dois fatores e atribue aquelas duas propriedades a uma unica substancia cristalina, pertencente ao grupo dos polipeptidos. O nome de *leucotaxina* foi proposto para esse material cristalino isolado dos exsudatos.

As observações referidas nos trabalhos anteriores sugerem fortemente a identidade entre o fator de permeabilidade e a histamina. As observações aqui apresentadas indicam que o fator quimiotactico não tem nenhuma relação com o fator de permeabilidade.

1) A histamina diluida a 1/25.000 não exerce nenhuma influencia quimiotactica sobre os leucocitos, induzindo, entretanto, um forte aumento da permeabilidade capilar.

2) Os exsudatos inflamatorios hidrolisados com NaOH, de maneira a eliminar a histamina, são capazes de exercer uma nitida influencia quimiotactica sobre os leucocitos.

STUDIES ON INFLAMMATION.

III - Concerning the chemotaxic factor of inflammatory Exudates.

Abstract

Inflammatory exudates contain both a permeability and a chemotaxic factor. Menkin *could not dissociate these two factors and refers them to a single crystalline substance belonging to the group of simple polypeptides. The name leucoctaxine has been proposed for this crystalline material recovered from the exudates.*

The observations noted in the preceding papers (1, 2) strongly suggest the identity between the permeability factor and histamine. The observations presented herewith indicate that the chemotaxic factor is by no means related to the permeability factor.

1) Histamine diluted 1:25,000 (average histamine equivalent of inflammatory exudates) is not positively chemotaxic, but induces increased capillary permeability.

2) The inflammatory exudates hydrolyzed with NaOH, in order to eliminate histamine are still able to exert chemotaxic influence on leucocytes.

From the experiments reported in this paper no conclusion can be drawn concerning the relation of Menkin's *crystalline material to the mechanism of cellular migration, but only in regard to the independence between the permeability and chemotaxic factors (referable to leucotaxine according to* Menkin*).*

In view of the fact that several products of protein metabolism (amino-acids, amines, etc.) are capable of inducing leucocytic migration, only the certitude of the chemical purity of the crystalline substance recovered from the exudates, and a careful analysis of the conditions under which the formation of this substance takes place, could establish the existence of this particular chemotaxic factor in a definite way.

BIBLIOGRAFIA

1 — Bier, O. & Rocha e Silva, M. — 1938 — Estudos sobre inflamação. I. *Arq. Inst. Biol.*, **9**, 109-122.

2 — Bier, O. & Rocha e Silva, M. — 1938 — Estudos sobre inflamação. II. *Arq. Inst. Biol.*, **9**, 123-128.

3 — Menkin, V. — 1938 — Studies on Inflammation XIV. *Journ. Exp. Med.*, **67**, 145-152.

———o———

Vol. 9 — Art. 15 Outubro de 1938

HISTAMINA E FENOMENO DE SHWARTZMAN

POR

M. Rocha e Silva & O. Bier

Do Instituto Biologico de S. Paulo

Com 6 figuras no texto

A ocorrencia de dóses elevadas de histamina em regiões de pele tratadas por diversos agentes deleterios, tem sido indicada por diversos pesquizadores. Loos (1931) em inflamações purulentas da pele, encontrou forte aumento do conteúdo histaminico, equivalente a varias vezes o conteúdo histaminico da pele normal. Feldberg & Schilf (1930) se referem a resultados em que o mesmo fato foi verificado em diversas ocorrencias, parecendo mesmo constituir um caracteristico comum a todas as lesões da pele essa elevação do conteúdo histaminico nas áreas lesadas.

Recentemente Riesser (1937) estudou novamente a questão e pôde mostrar uma elevação de algumas vezes o conteúdo normal, da histamina na pele de coelhos submetidos a dois tipos de inflamação: uma inflamação banal, produzida pela injeção intradermica de oleo de mostarda e uma inflamação alergica (fenomeno de Arthus) produzida pela injeção subcutanea de repetidas dóses de sôro de carneiro inativado e uma injeção final, depois de 10 dias de intervalo, do mesmo sôro. Particularmente, no caso da inflamação alergica, a lesão hemorragica e necrotica era acompanhada de uma elevação forte do teôr em histamina, de 4 a 10 vezes o teôr habitual em coelhos normais.

Ao lado desse aumentado teôr em histamina, outros caracteristicos são comuns a lesões da pele, produzidas pelos mais variados agentes deleterios. Recentemente Zander (1937) mostrou um quadro das variações da resistencia dos capilares cutaneos, que se repetia em seguida á injeção dos mais variados agentes inflamatorios tais como irritantes quimicos, suspensão de bacterias mortas, injeção de antigenos em animais sensibilizados (inflamação alergica), injeção de filtrados bacterianos Shwartzman ativos, etc. Esse quadro se caracterizava por um aumento muito forte da resistencia capilar, logo depois da injeção do agente deleterio, e em seguida uma descida até abaixo do normal, do valor dessa resistencia, 6 horas depois da injeção intradermica. Durante 48 horas aproximadamente, persistia aquele abaixamento da resistencia capilar.

Por outro lado, a injeção dos filtrados bacterianos Shwartzman ativos é acompanhada de reações locais, mais ou menos intensas, se-

melhantes ás reações produzidas pela injeção de diversos agentes deleterios (Moritz, 1937). Embora não haja paralelismo entre essas lesões e a intensidade com que é desencadeado o fenomeno de Shwartzman, em seguida á injeção intravenosa do mesmo filtrado (Shwartzman, 1936, Gerber, 1936, Moritz, 1937, etc.), era de esperar uma elevação do conteúdo histaminico nas áreas assim tratadas.

Na literatura são escassas as indicações sobre o papel que poderia desempenhar a histamina no desenvolvimento do fenomeno. Embora todas as tentativas de reforçar o fenomeno com injeções de histamina, na área preparada, tenham sido infrutiferas (Shwartzman, 1932, 1936), Gratia & Linz (1932) admitiram a possibilidade da histamina explicar, em parte, o efeito produzido ao nivel dos vasos, diminuindo a resistencia dos capilares á suposta substancia angiotoxica que seria gerada depois da injeção desencadeante, na área previamente tratada.

Recentemente Kourilski, Guillot & Ong Sian Gwan (1938) observaram um abaixamento forte do conteúdo histaminico nas áreas portadoras de lesões de Shwartzman. Entretanto, no trabalho destes autores faltam completamente dados sobre o momento em que foi feita a dosagem, depois da injeção desencadeante.

Nas experiencias referidas abaixo, realizamos dosagens de histamina em regiões da pele, em dois lotes de coelhos normais e tratados pela reação de Shwartzman. Procuramos verificar assim se esse caracter comum á maioria das lesões cutaneas, o elevado teôr em histamina no local lesado, está tambem presente nas lesões de Shwartzman.

MATERIAL E METODO

O fenomeno de Shwartzman era reproduzido em coelhos de tamanhos diversos, pela injeção intradermica de 0,3 cc. de uma endotoxina tifica, preparada segundo a técnica de Besredka, e injeção intravenosa 24 horas depois de 2 cc. da mesma toxina. A biopsia do fragmento de pele portador da lesão de Shwartzman era praticada com material esteril, sem anestesia, ou ligeira anestesia pelo éter. Depois da retirada do fragmento, a chaga era fechada com agrafes. As hemorragias eram evitadas, tanto quanto possivel. Geralmente os fragmentos eram retirados sucessivamente, logo depois de declarado o fenomeno, com intervalos apenas necessarios para a pesagem dos fragmentos e trituração deles em presença do acido tricloracetico. Por exceção, no caso do coelho 3, a biopsia foi feita depois de 24 horas do fenomeno declarado. O edema era então já muito intenso, o que permitiu a retirada de mais de 2 gramas de material, de uma região relativamente pequena de pele. Nos coelhos normais, o material era quasi exclusivamente constituido de pele, sendo muito facil a clivagem desta ultima, do tecido conjuntivo subjacente. Nos coelhos portadores de lesões de Shwartzman, o material era geralmente constituido pela pele, aderente a quantidades apreciaveis de tecido conjuntivo subcutaneo, mais ou menos edemaciado e hemorragico. As anotações da tabela 2 dão uma indicação aproximada da in-

tensidade do fenomeno. Nos coelhos portadores de lesões de Shwartzman, era geralmente feita uma biopsia de tecido são, retirado de regiões da pele bastante afastadas das zonas injetadas. Os fragmentos de pele assim obtidos, são indicados no quadro como fragmentos de pele não injetada.

Para a extração de histamina dos fragmentos de pele foi utilizada a modificação do metodo de Barsoum & Gaddum, introduzida por Code (1937). O fragmento de pele, previamente pesado, era triturado em um grál, depois de finamente dividido com tezoura afiada, em presença de alguns centimetros cubicos de acido tricloracetico a 10 %. O material reduzido a uma massa dissociada era mantido, no acido tricloracetico, durante 2 horas agitando-se constantemente. Em seguida o sobrenadante era colhido, mediante cuidadosa filtração por sucção. O filtro era ainda lavado 2 ou 3 vezes com uma solução de acido tricloracetico a 5 %. O liquido perfeitamente limpido, assim obtido, era então fervido durante 1 hora em presença de HCl concentrado (5 cc. de HCl Merck, para o total do liquido). Depois da fervura, o liquido era então concentrado no vacuo, e depois de 2 adições de 20 cc. de alcool etilico, era completamente secado. Depois das duas adições de alcool, a maior parte do HCl era eliminada. O residuo sêco assim obtido era extraído com uma pequena quantidade de agua fisiologica. Depois de neutralização cuidadosa com NaOH normal, o volume do extrato era finalmente completado a 5 cc. com água fisiologica. (A neutralização geralmente coincidia com a precipitação de um material gelatinoso, facilmente afastado pela filtração. O liquido final, ligeiramente amarelado, era sempre limpido).

O liquido assim obtido, contendo a histamina total do fragmento, era então testado sobre ileo de cobaia, com a técnica de Guggenheim & Löffler. Um fragmento de intestino, de 3 a 4 cc., era suspenso em pequena cuba, de 7 a 8 cc.

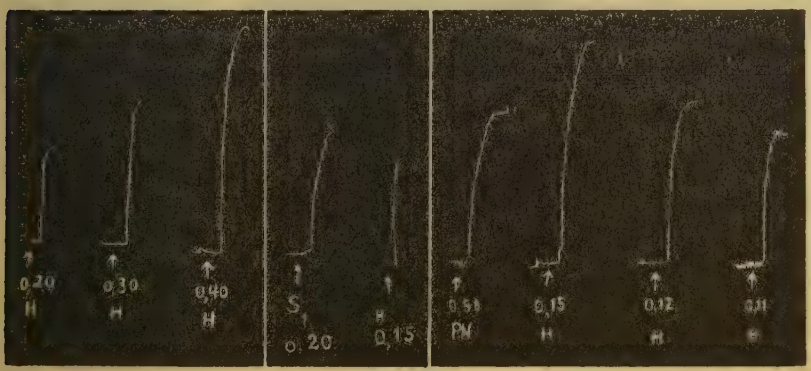


Fig. 1 Fig. 2 a Fig. 2 b

Fig. 1 — Ileo de cobaia. Ação de doses decrescentes de histamina sobre o intestino isolado de cobaia. H = sol. histamina 1/250.000.

Fig. 2 a — Coelho n.º 1. H = sol. histamina 1/500.000. 0,19 S_1 = 0,15 H. Histamina em 1 gm. = 6,4 γ.

Fig. 2 b — Coelho n.º 2. H = sol. histamina 1/250.000. 0,50 PN = 0,12 H. Histamina em 1 gm. = 4,27 γ.

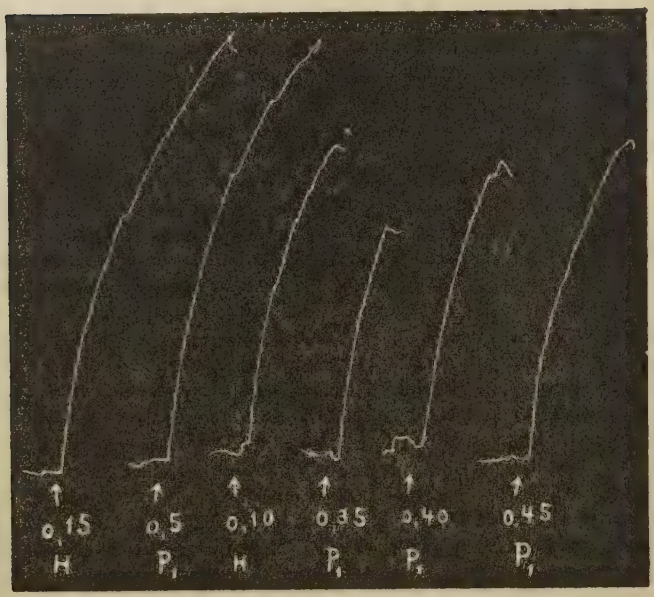


Fig. 3 — Coelho n.º 7. H = histamina 1/250.000. 0,40 P_1 = 0,10 H. Histamina em 1 gm. = 5,2 γ.

Fig. 4 — Coelho n.º 9. Histamina 1/125.000. 0,27 H = 0,50 S_1. Histamina em 1 gm. = 24,69 γ.

de capacidade, montado no aparelho já descrito anteriormente (8). As adições de quantidades conhecidas de histamina (Histamina GRÜBLER) e das quantidades medidas dos extratos de pele, eram feitas com intervalo de 2 a 3 minutos, substituindo-se a cada adição o Ringer da cuba. De modo geral, os tempos eram aproximadamente os seguintes: $^1/_2$ minuto para a contração, $^1/_2$ minuto para a

substituição do Ringer, $1\,^1/_2$ minuto de descanço do musculo. As respostas deste ultimo eram quantitativas e regulares. Quando se trabalhava com ileo, geralmente o chamado *Übung*, descrito por Riesser (1937) era mesmo dispensado, reagindo o musculo regularmente, já em seguida ás primeiras adições de histamina. (Fig. 1).

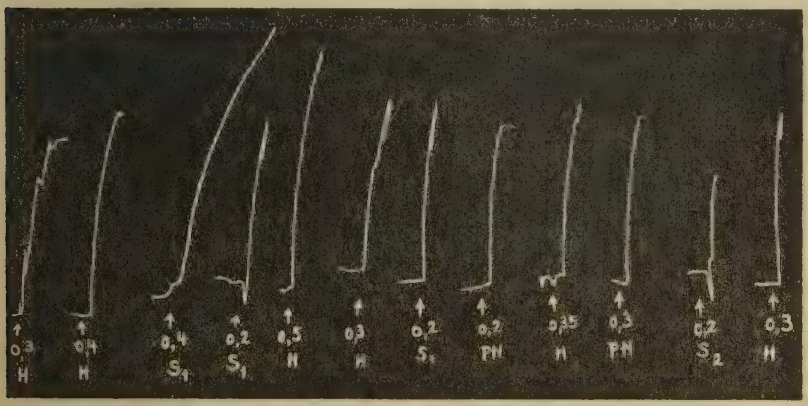


Fig. 5 — Coelho n.º 5. H = sol. Histamina 1/125.000. 0,30 PN = 0,30 H. Histamina em 1 gm. = 3,43 γ. 0,20 S_1 = 0,35 H. Histamina em 1 gm. = 24,5 γ. 0,40 S_2 = 0,35H. Histamina em 1 gm. = 28,0 γ.

Fig. 6 — Coelho n.º 4. H = histamina 1/125.000 0,70 PN = 0,35 H. Histamina em 1 gm. = 13,6 γ. 0,70 S_2 = 0,85 H. Histamina em 1 gm. = 22,0 γ.

As figuras de 2 a 6 ilustram o metodo de dosagem e dão uma idéa da precisão atingida nos ensaios. Uma ou outra vez repetiamos a mesma dosagem em dois fragmentos de ileo, e as variações para mais e para menos em relação á média das duas determinações oscilava entre 5 % e 10 %.

RESULTADOS

E' sabido que o conteúdo histaminico de um mesmo orgão póde oscilar, de um animal para outro, dentro de limites muito extensos. Nas nossas determinações esse valor esteve compreendido entre 4,27 γ e 12,73 γ por gm. de pele. Num mesmo animal, entretanto, o conteúdo histaminico oscilava dentro de limites mais estreitos, não excedendo de 10 % (tab. 1).

TABELA 1

Dosagem da histamina na pele de coelhos normais.

N.º do coelho	Peso do coelho em gms.	Peso do fragmento em gm.	Dosagem da histamina (em γ)		Médias
			Total	Em 100 gms. de tecido	
1	—	0,900	5,78	640	
1		0,892	5,26	590	
1		0,645	3,20	496	575
2	—	0,548	2,60	474	
2		0,810	3,46	427	450
7	1.680	0,960	5,00	520	520
8	1.490	0,980	12,48	1.273	1.273
Média geral					704

Os resultados obtidos com coelhos que apresentavam uma reação de Shwartzman bastante evidente, mostraram um nitido aumento de conteúdo histaminico, não só ao nivel das lesões hemorragicas, como ainda, ao nivel de regiões de pele não atingidas pela lesão. No caso do coelho n.º 6, o teôr em histamina, 30 minutos depois do desencadeamento da lesão, tinha um valor quasi 8 vezes superior á média do teôr nos coelhos normais. Nos fragmentos de pele não injetados esse teôr mostrou-se sempre da mesma ordem de grandeza da dos fragmentos atingidos pela lesão de Shwartzman. Essa elevação do conteúdo histaminico, em relação ao normal, nos fragmentos de pele não injetados com a toxina, verificou-se nas dosagens realizadas nos coelhos 3, 4 e 5.

No caso do coelho n.º 3, a biopsia do fragmento de pele atingida pela lesão, foi feita 24 horas depois da injeção desencadeante, o que poderia explicar o baixo teôr em histamina aí encontrado. No fragmento não injetado de pele, a uma distancia apreciavel da lesão, o teôr em histamina estava entretanto nitidamente acima do normal.

TABELA 2

Dosagem de histamina em fragmentos de pele de coelhos portadores de lesão de Shwartzman.

N.º do coelho	Peso do coelho	Peso do fragmento	Tempo decorrido, depois da 2.ª injeção	Intensidade do fenomeno	Dosagem da histamina nas areas injetadas (em γ)		Dosagem de histamina em fragmentos de pele não injetada (em γ)	
					Total	em 100 gms.	Total	em 100 gms.
3	1.050	2,120	24 horas	+++	12,0	624	—	—
3		0,513	24 horas	—	—	—	14,9	2.770
4	2.770	0,110	3h 30'	++	14,25	1.290	—	—
4		1,075	3h 45'	+(+)	34,80	3.200	—	—
4		1,055	4h 00'	—	—	—	14,25	1.360
5	1.230	1,645	30 min.	+	70,0	4.250	—	—
5		1,250	45 min.	+	35,0	2.800	—	—
5		1,165	1 hora	—	—	—	40,0	3.430
6	—	0,290	30 min.	eritema +	16,2	5.600	—	—
6		0,390	1h 40'	++	7,2	1.850	—	—
9	1.340	0,875	2h 30'	++	21,60	2.469	—	—
9		0,720	2h 50'	+	13.30	1.861	—	—
Médias:						2.660		2.580

A explicação daquele baixo conteúdo histaminico ao nivel da lesão, poderia talvez residir não só na diluição da histamina pelo liquido do forte edema hemorragico, como ainda na difusão, para a corrente circulatoria, da histamina libertada ao nivel do fóco da lesão.

No caso do coelho n.º 6, uma dosagem da histamina num outro fragmento lesado, retirado do animal 1h,10' depois do primeiro, mostrou um teôr histaminico nitidamente reduzido.

DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

A ocorrencia de dóses elevadas de histamina em reações alergicas da pele, como no fenomeno de Arthus, foi demonstrada recentemente por RIESSER (1937). Ora, os aumentos por nós verificados na lesão de Shwartzman, são da mesma ordem de grandeza dos observados por RIESSER para a inflamação alergica, e nitidamente mais importantes do que os observados pelo mesmo autor para uma inflamação com oleo de mostarda. No caso do coelho n.º 6, observamos um aumento de cerca de 8 vezes em relação aos controles. Em média, o aumento não foi superior a 4 vezes o valor médio do teôr histaminico dos coelhos normais.

Digno de nota é o fato de exibir toda a pele dos coelhos submetidos ao fenomeno de Shwartzman, mesmo em pontos afastados da

lesão, um aumento do teôr histaminico. Dosagens da histamina em regiões da pele não atingidas pela lesão mostraram um conteúdo histaminico, não só algumas vezes superior á média obtida com coelhos normais, como ainda da mesma ordem de grandeza do conteúdo histaminico dos fragmentos portadores da lesão de Shwartzman.

Si esse fato se confirmar em determinações mais numerosas, mostrará com toda evidencia que a pele toda do coelho preparado para o fenomeno de Shwartzman, estaria de certo modo mais sensivel do que a do coelho normal, no tocante á capacidade de provocar, sob a ação de agentes excitantes, dilatações capilares locais, pela libertação daquela histamina aí encontrada em dóses aumentadas.

Recentemente FELDBERG & KELLAWAY (1937) mostraram um paralelismo entre o conteúdo histaminico dos pulmões, e as modificações morbidas produzidas pelo veneno de cobra ou pela propria histamina. Gatos jovens, cujo conteúdo em histamina do pulmão era muito baixo, mostravam-se tambem insensiveis á injeção da histamina: a pressão da arteria pulmonar elevava-se de maneira insignificante á injeção de uma dóse apropriada de histamina. Ao contrario, a mesma dóse de histamina produzia em gatos maiores, com um grande teôr histaminico do pulmão, uma rapida elevação da pressão da arteria pulmonar.

Se fenomeno semelhante se passasse ao nivel da pele, os coelhos tratados com a toxina tifica, mostrando um teôr histaminico aí muito aumentado, deveriam mostrar, sob a ação de agentes deleterios, perturbações mais profundas da permeabilidade capilar, do que os coelhos normais. Isso por dois motivos: 1.º) porque o elevado teôr histaminico das suas celulas acarretaria uma maior sensibilidade daqueles vasos á propria histamina; 2.º) esse conteúdo de histamina aumentado permitiria, a qualquer momento, a mobilização de uma quantidade maior de histamina na área lesada. O papel que póde desempenhar, no desencadeamento do fenomeno, essa *minor resistentia* oferecida pelos capilares aos agentes deleterios, não é dificil de prevêr, podendo constituir um fator adjuvante importante no desenvolvimento do fenomeno, de acôrdo com a hipotese emitida em 1932 por GRATIA & LINZ.

A diminuição do teôr em histamina nas áreas lesadas pelo fenomeno de Shwartzman, como foi observada nos coelhos 3 e 6, poderia ser explicada pela transformação das ligações que apresenta a histamina com os coloides celulares, passando de uma forma indifusivel, a substancia-H de LEWIS, para uma forma difusivel, dialisavel, a histamina livre das suas conexões frouxas com os coloides celulares (DALE, 1929). Essa mudança de forma da propria histamina permitiu já a explicação dos resultados obtidos por HARRIS (1927) que, imergindo uma pata de um gato em agua fervendo, observou uma diminui-

ção do conteúdo histaminico em relação á pata simetrica normal. Fenomeno semelhante foi observado por FELDBERG & SCHILF (1930) que verificaram uma diminuição do conteúdo histaminico de regiões de pele tratadas por queimaduras localizadas.

Essa libertação local da histamina, adquirindo esta ultima a capacidade de difundir-se, caíndo na corrente circulatoria ao fim de um tempo maior ou menor, explicaria os resultados contraditorios dos diferentes autores que pesquizaram o conteúdo histaminico de regiões de pele tratadas por diversos agentes deleterios. Assim, em seguida á irradiação da pele pelos raios ultra-violeta, LEWIS & ZOTTERMANN (1926) referem-se a uma libertação de histamina, nas áreas irradiadas; ELLINGER (1928) não observou nenhuma variação no conteúdo histaminico; TARRAS-WAHLBERG (1937) observa no gato, uma diminuição e no coelho, durante os 2 primeiros dias, um aumento e, tardiamente, uma forte diminuição daquele conteúdo.

Esse desaparecimento tardio da histamina nas áreas lesadas, em virtude de uma difusibilidade maior da histamina aí libertada, explicaria talvez ainda os resultados recentemente obtidos por KOURILSKY & COLS. (1938) em desacôrdo com os aqui relatados. Esses autores observaram uma diminuição forte do conteúdo histaminico nas áreas com lesão de Shwartzman, faltando entretanto no trabalho deles qualquer indicação da maneira por que as experiencias foram conduzidas e do tempo decorrido entre a injeção desencadeante e a biopsia do fragmento lesado.

HISTAMINE AND SHWARTZMAN PHENOMENON.

Abstract

1) This paper deals with estimations of the histamine equivalents in skin fragments of normal rabbits and of rabbits prepared by the intradermal injection of B. typhosus filtrate (Besredka disintegrate) followed 24 hours later by intravenous injection of the same filtrate (Shwartzman phenomenon).

The hemorrhagic reactions so obtained were severe and appeared sometimes as early as $^1/_2$ hour after the 2nd. injection.

2) The histamine was extracted from the skin fragments according to the technique recently introduced by CODE *(1937). The estimation of the histamine equivalents were made by the method of* GUGGENHEIM & LÖFFLER, *the lower portions of the ileum being used for the test.*

3) We found the histamine equivalents in the normal rabbits oscillating between 427 γ to 1,273 γ per 100 gms. of tissue, in accordance

with the results referred to by Riesser *(1937). The average histamine equivalent of 7 estimations on the skin fragments from four different normal rabbits, was 704 γ per 100 gms. of tissue.*

4) The results obtained in rabbits at skin sites showing the Shwartzman reaction, have pointed out an evident increase in the histamine equivalent of the injuried areas. In the fragments removed immediately after the beginning of the hemorrhagic reaction, these equivalents oscillated between 1,250 and 5,600 γ per 100 gms. of tissue. The estimation of the histamine equivalent in one fragment taken 24 hours after the 2nd injection, showed a marked decrease in the amount of histamine per 100 gms. of tissue (Rabbit 3).

5) We must emphazise the fact that even in the uninjected normal regions of the skin, far from the prepared sites, the histamine equivalent was distinctly above the normal. The average histamine equivalent obtained in the rabbits n.º 3, 4 and 5, from fragments of the skin, far from the hemorrhagic areas, was as high as 2,580 γ per 100 gms. of tissue, therefore 4 times the average in the normal rabbits.

6) The low histamine equivalent obtained in the injuried areas long after the starting of the phenomenon (see rabbits 3 and 6) would be explained by the breaking up of the loose binding of the histamine with the cell colloids (H-substance of Lewis), and then the freed histamine would diffuse in the circulating blood, leaving the injuried area.

7) These facts seem to be in agreement with the hypothesis early formulated by Gratia & Linz *(1932) of an adjuvant action performed by histamine on bringing forth the hemorrhagic injury at the prepared skin sites. Under the action of the histamine, liberated at the starting of the reaction, enhanced fragility of the capillaries even in sites distant from the local reaction takes place. This enhancement of the capillary permeability would facilitate the development of the hemorrhagic reaction under the influence of angiotoxic substances generated at the prepared sites following the provocative injection.*

BIBLIOGRAFIA

1 — Code, C. F. — 1937 — The quantitative estimation of Histamine in the Blood. *Journ. of Physiol.,* **89,** 257-268.

2 — Dale, H. H. — 1929 — Some chemical factors in the control of the circulation. Croonian Lectures II. *The Lancet,* **216,** 1232-1236.

3 — Feldberg, W. & Kellaway, C. H. — 1937 — The circulatory and pulmonary effects of the venom of the Australian Copperhead. *The Aust. Journ. of Exp. Biol. and Med. Science,* **15,** 81-95.

4 — Gratia, A. & Linz, R. — 1932 — Les phénoménes de Sanarelli et de Shwartzman ou l'allergie hémorrhagique. *Ann. Inst. Pasteur,* **49,** 131-185.

5 — Kourilski, R., Guillot, M. et Ong Sian Owan — 1938 — Etudes sur le mécanisme des lésions hémorrhagiques d'origine Allergique et Anaphylactique. *Revue d'Immunologie,* **4**, 230-262.

6 — Moritz, A. R. — 1937 — The relation of altered local tissue reactivity (Shwartzman phenomenon) to infection and inflammation. *J. of Exp. Med.*, **66**, 603-616.

7 — Riesser, O. — 1937 — Histaminstudien. *Arch. f. Exp. Path. und Pharmak.*, **187**, 1-21.

8 — Rocha e Silva, M. — 1938 — Metodo de dosagem da histamina nos liquidos e tecidos organicos. *Acta Medica,* **2**, 40-50.

9 — Shwartzman, G. — 1932 — Further studies on the nature of the phenomenon of local skin reactivity to bacterial filtrates: toxic factors derived from the blood serum. *Journ. of Exp. Med.*, **56**, 291-305.

10 — Shwartzman, G. — 1936 — Phenomenon of local skin reactivity to bacterial filtrates: effect of bacterial filtrates injected intravenously upon reactions to antigen + antibody complexes. *Journ. of Exp. Med.*, **64**, 529-551.

11 — Tarras-Wahlberg, B. — 1937 — Über den Histamingehalt der Haut nach Ultravioletbestrahlung. *Klin. Woch.*, **16**, 958-960.

12 — Zander, E. — 1937 — Changes in blood vessels (capillary fragility) with inflammation. *J. of Exp. Med.*, **66**, 651-673.

———o———

Vol. 9 — Art. 16 Outubro de 1938

AÇÃO DA TRIPSINA SOBRE O INTESTINO E UTERO ISOLADOS DE COBAIA; LIBERTAÇÃO DE HISTAMINA DO PULMÃO, PELA PERFUSÃO COM SOLUÇÕES DE TRIPSINA

POR

M. Rocha e Silva

Do Instituto Biologico de S. Paulo

Com 10 figuras no texto

Em 1929, KELLAWAY descreveu a ação do veneno de cobra sobre o utero de cobaia. A adição do veneno a um banho de Ringer contendo o utero isolado, determinava uma contração do musculo, depois de curto periodo de latencia. Uma segunda adição de veneno era sem efeito, mostrando-se o musculo dessensibilizado em seguida á primeira contração. A adição de pequenas dóses, insuficientes para desencadear a reação, determinavam, entretanto, a dessensibilização do orgão para dóses mais fortes.

Segundo KELLAWAY, a reação ao veneno de cobra seria indireta, pela libertação de uma substancia estimulante, muito provavelmente a histamina, normalmente ligada ás proteinas celulares.

Em 1930, ESSEX & MARKOWITZ confirmaram as observações de KELLAWAY, e, fazendo extratos dos venenos de cobra utilizados, puderam mostrar que aquela ação não podia correr por conta de impurezas de histamina existentes no veneno. Mostraram ainda que o tempo latente que precede a contração do utero de cobaia em seguida á adição do veneno de cobra, era de cerca de 30 segundos.

Em trabalho recente FELDBERG & KELLAWAY (1937 *b*) estudaram ainda a ação do veneno de cobra sobre o intestino isolado de cobaia.

A adição do veneno ao banho de Ringer, contendo o musculo isolado, determina, depois de curto periodo de latencia, uma elevação rapida do tonus que resiste a lavagens sucessivas com novo Ringer. Depois da adição de uma ou duas doses iguaes do veneno, o musculo se mostra insensivel a essa dose, reagindo entretanto, embóra menos intensamente, á adição de doses mais elevadas. Aqui tambem, a libertação de doses pequenas da histamina, normalmente ligada aos coloides tissulares, explicaria aquela contração tonica. As lavagens com novo Ringer seriam insuficientes para afastar a histamina que se libertaria na propria intimidade do musculo.

Mais recentemente, RICHTER (1938) estudou a ação dos venenos de *Crotalus atrox* e de abelha, sobre a musculatura lisa do intestino, mostrando que ambos contêm um principio identico, estimulante da musculatura lisa do intestino. RICHTER, entretanto, põe em duvida a explicação proposta por KELLAWAY, duma libertação de histamina na propria intimidade do tecido, embóra o faça sem argumentos muito substanciais. Ora, a explicação dada primitivamente por KELLAWAY repousa no fato recentemente (1937 *b*) posto em evidencia por FELDBERG & KELLAWAY de uma libertação de histamina do pulmão de cobaia, sob a ação do veneno de cobra. A perfusão do pulmão com quantidades variaveis de venenos de diversas especies de cobra determina a libertação de uma substancia estimulante da musculatura lisa do intestino e farmacologicamente identica á histamina. Assim, mesmo que um outro mecanismo se associasse na produção da contração do intestino isolado, é fóra de duvida que uma libertação de histamina do proprio intestino, pelo veneno, deve contribuir para a intensidade do efeito observado.

Que a ação farmacologica do veneno de cobra não se deve limitar aos efeitos de uma simples libertação de histamina dos tecidos, ressalta com muita clareza de um grande numero de trabalhos experimentais. Assim, por exemplo, ESSEX & MARKOWITZ (1930 *c*) verificaram que em $^2/_3$ dos casos, o espasmo bronquial desencadeado pela injeção do veneno de *Crotalus atrox,* em cobaias, não é total, não podendo portanto explicar a morte rapida do animal. FELDBERG & KELLAWAY (1937 *a* e *c*) mostraram que, embóra concordantes em muitos pontos, os sintomas produzidos pela histamina, com os produzidos, em cães e gatos, pela injeção dos venenos de *Naia naia* e *Denisonia superba,* algumas particularidades da ação destes ultimos, não poderiam ser explicadas por uma simples libertação de histamina. Finalmente, DRAGSTEDT, MEAD & EYER (1938) demonstraram que a quantidade de histamina libertada era inadequada para explicar todas as perturbações circulatorias observadas no cão, em seguida á injeção de veneno de *Crotalus atrox.*

De fato o fracionamento do veneno de cobra tem fornecido substancias neurotoxicas (FLEXNER & NOGUCHI, 1903; MINZ, 1908; MANWARING, 1910; KLOBUSITZKY, 1935; VAN ESWELD, 1936; SLOTTA & CONRAT, 1938; etc.), substancias hemoliticas e impedientes da coagulação (HIRSCHFELD & KLINGER, 1915; DANN, 1934), substancias coagulantes (MARTIN & MC GARVIE SMITH, 1892; MARTIN, 1896; etc.) e agentes proteoliticos (FLEXNER & NOGUCHI, 1902; NOC, 1904; HOUSSAY & NEGRETE, 1918; HANSEN, 1931; EAGLE, 1937; etc.). Evidentemente todos esses agentes toxicos se imbricam e agem sinergicamente na produção dos efeitos farmacologicos atribuidos ao veneno de cobra.

As experiencias referidas abaixo sugerem que, pelo menos em parte, a atividade proteolitica dos venenos de cobra deve ser responsavel pela libertação da histamina dos tecidos animais.

Com um agente proteolitico, a tripsina, ativo nas condições de pH dos tecidos vivos, foi possivel reproduzirem-se efeitos sobre a musculatura lisa do intestino e utero de cobaia, bem como uma libertação de histamina do pulmão, em tudo comparavel ao que se obtem em condições analogas com o veneno de cobra.

METODO

Cobaias de peso médio eram mantidas em jejum durante 12 horas. Em seguida eram sacrificadas com um golpe na nuca; fragmentos de ileo, retirados imediatamente depois da morte, eram mantidos em Ringer durante 10' a 37°. As fézes eram facilmente removidas, injetando-se na luz do intestino, com uma seringa de injeção, Ringer aquecido a 37°. O fragmento de intestino era finalmente suspenso em Ringer anafilatico (Dale), contido numa cuba montada no aparelho já descrito por nós (1938). Em algumas das experiencias a cuba era relativamente ampla, com uma capacidade de 20 cc. depois da introdução do fragmento de intestino. Para a dosagem dos perfusatos de pulmão, foi utilizado o mesmo dispositivo, empregando-se entretanto cubas de pequena capacidade, de cerca de 5 a 7 cc., depois da introdução do fragmento. Com uma cuba de tamanho reduzido, a sensibilidade do metodo é bastante grande para indicar a presença de frações de gama (γ) de histamina nos liquidos testados. Conforme a sensibilidade do intestino, a solução test de histamina variava de 1/100.000 a 1/1 milhão (Histamina GRÜBLER).

As soluções tests eram preparadas na hora, a partir de uma solução de histamina a 1/25.000, mantida na geladeira.

A tripsina utilizada foi um preparado comercial (SCHERING). Uma grande parte do produto era insoluvel em agua fisiologica, de maneira que a indicação da concentração das soluções de tripsina empregadas têm um valor secundario, significando apenas quantidades relativas. Depois de pesada uma certa quantidade (0,2 a 2 gms.) do preparado comercial, 100 cc. de agua fisiologica eram adicionados e deixados em contato durante alguns minutos, agitando-se constantemente. Depois de filtração em papel, a solução limpida obtida era testada sobre caseina (solução a 0,1 % em 0,1 % de carbonato de sodio). Geralmente a digestão total se fazia, mesmo com diluições fortes (sol. a 0,004 % de tripsina), em menos de 10 minutos, a 40°. Com soluções de tripsina mais concentradas, a digestão era quasi intantanea. Um test, feito 1 minuto depois da adição de tripsina, indicava uma digestão completa da caseina.

Em algumas das experiencias utilizamos uma tripsina dialisada em celofane, contra agua distilada. Da tripsina assim dialisada, fizemos extrações de histamina, pela técnica de Barsoum & Gaddum (1935). A dosagem sobre intestino de cobaia revelava então, praticamente, ausencia completa de histamina (concentração inferior á de uma solução de histamina a 1/40 milhões).

Na experiencia com utero de cobaia, utilizamos um animal relativamente grande (410 gms.) mantido, durante 4 mêses, rigorosamente separado do macho. Os cornos uterinos eram potentes, medindo cerca de 5 cms. Um contra-peso de 2 gms., fixado na alavanca, foi utilizado.

O dispositivo para a perfusão do pulmão foi aproximadamente o mesmo descrito por Bartosch, Feldberg & Nagel (1932) para a perfusão, com o antigeno, do pulmão de cobaias sensibilizadas. O Ringer previamente aquecido, depois de passar por uma serpentina mergulhada em agua quente (40°), entrava por uma canula, inserida na arteria pulmonar. A auricula esquerda era largamente aberta, e deixava escapar o liquido de perfusão. O pulmão era retirado da caixa toraxica e mantido sobre um molde apropriado de celuloide. Nesse momento, com o auxilio de uma canula inserida na traquéa, iniciava-se a respiração artificial (9 a 11 inspirações por minuto). Os liquidos de perfusão eram colhidos por meio de uma goteira do molde de celuloide, com intervalos de 15 a 30 minutos. Antes de injetar a solução de tripsina, colhia-se o liquido de perfusão durante 15 a 20 minutos. Todos os liquidos de perfusão eram finalmente extraídos com a técnica de Barsoum & Gaddum, simplificada por Code (1937): Ao liquido de cada perfusato era adicionado acido tricloracetico até turvação maxima. Depois de cuidadosa filtração, o filtrado era então fervido durante 30' com HCl concentrado. A fervura era levada até quasi secagem completa do liquido, quando os sais precipitavam com abundancia. A adição de uma pequena quantidade de alcool a 96°, saturado de NaCl, facilitava o afastamento daquele excesso de sais por filtração, o que permitia uma grande redução final do volume do extrato. O extrato alcoolico era secado no vacuo, o HCl afastado por forte corrente de ar e o residuo finalmente extraído com 5 cc. de agua fisiologica. O extrato obtido era neutralizado e filtrado sobre papel. O afastamento daqueles sais se tornava indispensavel quando um grande volume (ás vezes 40 cc.) do perfusato era empregado para a extração. A redução do volume para 5 cc. produziria uma forte concentração (8 vezes) dos sais do primitivo Ringer, o que seria nocivo ao musculo isolado.

RESULTADOS

1. Ação da tripsina sobre o intestino isolado de cobaia

A adição de doses determinadas de histamina a um banho de Ringer, contendo um fragmento de intestino bastante fresco, produz contrações imediatamente reversiveis, em seguida á lavagem com novo Ringer. O musculo volta ao tonus primitivo, de maneira perfeitamente regular (fig. 1). Depois de duas ou tres adições de uma mesma quantidade de histamina, as reações do musculo se tornam muito regulares.

A adição de uma solução de tripsina ao banho de Ringer é seguida de uma rapida contração, precedida de curto periodo de latencia, rapidamente reversivel com a substituição do Ringer. Depois desta lavagem, desencadeia-se uma lenta e prolongada contração, resistente a substituições repetidas do Ringer (fig. 2). Duas ou tres adições de tripsina, tornam geralmente o musculo insensivel á mesma dose de tripsina, embóra reagindo á histamina. Esse fenomeno, que póde ser observado na fig. 2, é muito semelhante ao descrito por Feldberg & Kel-

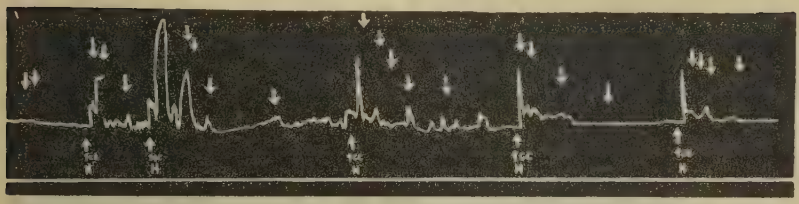


Fig. 1 — Intestino (ileo) fresco de cobaia, *in vitro*. Ação de uma solução pura de histamina 1/125.000. Capacidade da cuba 20 cc. Oxigenação ótima. Note-se a permanencia do tonus durante todo o tempo de duração da experiencia (45'). As setas superiores indicam lavagem com novo Ringer.

LAWAY para o veneno de cobra e póde ser aqui tambem designado como dessensibilização á tripsina.

Essa dessensibilização póde ser ainda observada na figura 3, onde foi empregado um intestino de cobaia que reagia de maneira peculiar

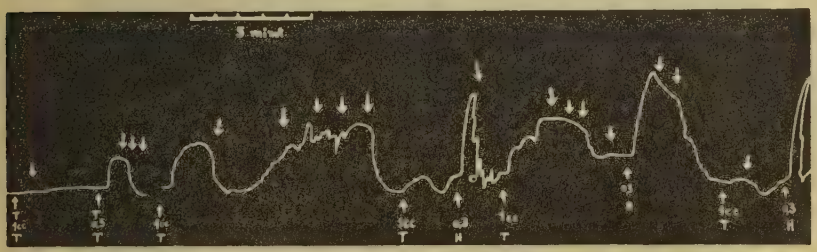


Fig. 2 — Ação de uma solução de tripsina a 0,2 %, sobre o intestino isolado de cobaia. Mesmas condições da fig. 1. H = sol. de histamina a 1/125.000. T = sol. de tripsina a 0,2 %.

á histamina. No fim da experiencia verificou-se que restos de fézes, deixados na sua luz, impediam uma contração apreciavel da musculatura, sob a ação da histamina. Entretanto, depois de 3 a 4 adições, passou a responder de maneira muito regular a 0 cc,30 de histamina a 1/125.000. A adição de uma solução de tripsina a 0,004 % (T/50) produziu, depois de um prolongado tempo de latencia, uma contração nitida. Na quarta adição esse tempo de latencia se mostrou muito prolongado, e na quinta adição o musculo se mostrava dessensibilizado para aquela dose de tripsina (0 cc,50 T/59). Entretanto, a adição de uma dose 50 vezes maior (T), produziu ainda uma nitida contração, com largo tempo de latencia. Finalmente o musculo se apresentou dessensibilizado tambem para essa dose, mantendo-se entretanto sensivel á histamina.

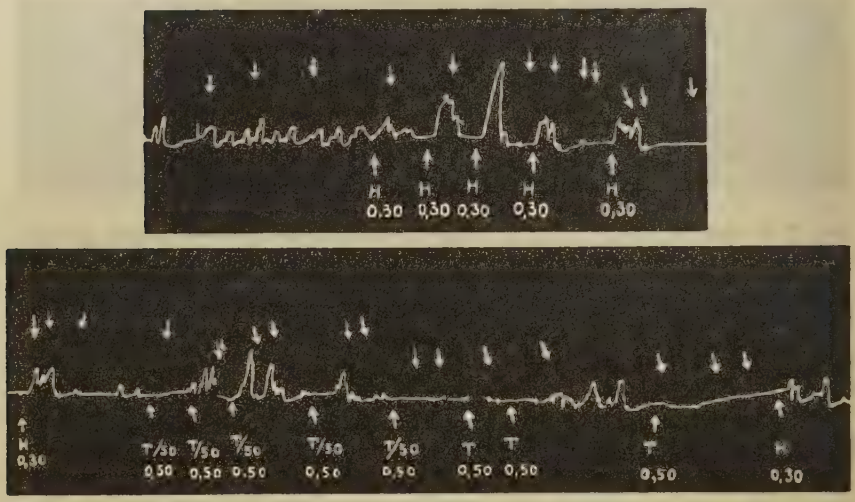


Fig. 3 — T = solução de tripsina a 0,2 %. T/50 = solução de tripsina a 0,004 %. H = sol. de histamina 1/125.000. O musculo primeiramente é dessensibilizado para a solução diluida de tripsina, depois para a solução mais concentrada. (O traçado inferior é a continuação do traçado superior).

Essa dessensibilização do musculo á tripsina póde ser observada ainda na figura 4. Em seguida á 4.ª adição da solução de tripsina, o musculo se mostrou completamente inativo, embóra reagisse prontamente á adição de histamina. Póde-se vêr ainda, na fig. 4, a lenta contração que se desencadeia alguns segundos depois da adição da tripsina. Logo em seguida á primeira adição do fermento, póde-se notar uma rapida contração, que não se repete nas adições seguintes.

Essa primeira contração rapida, reversivel, para a qual o musculo se torna dessensibilizado em seguida á primeira adição, póde ser vista nas duas experiencias (fig. 5 *a* e *b*) realizadas com uma cuba de 6 cc. de capacidade e com uma tripsina dialisada durante 4 dias. O extrato, pelo metodo de Barsoum & Gaddum, desta tripsina dialisada, revelou um conteúdo de histamina no maximo comparavel ao de uma solução a 1/40 milhões. Ora, os intestinos utilizados nas duas experiencias eram insensiveis á adição de 0cc,50 de uma solução a 1/40 milhões de histamina.

Na fig. 5, *a* e *b*, pode-se vêr essa contração rapida, reversivel, e que poderia ser explicada por uma libertação de histamina dos tecidos externos do orgão. Depois da lavagem, desencadeia então a contração lenta, rebelde a sucessivas lavagens e que se originaria de uma libertação interna, na propria massa muscular, de doses pequenas e progres-

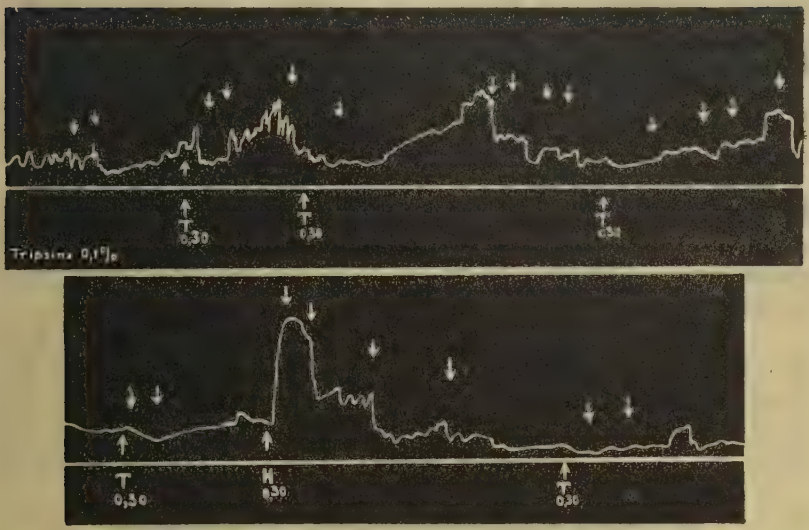


Fig. 4 — T = solução de tripsina a 0,1 %. H = sol. de histamina a 1/125.000. Mesmas condições das experiencias anteriores. Notar dessensibilização á tripsina. (O traçado inferior é a continuação do traçado superior).

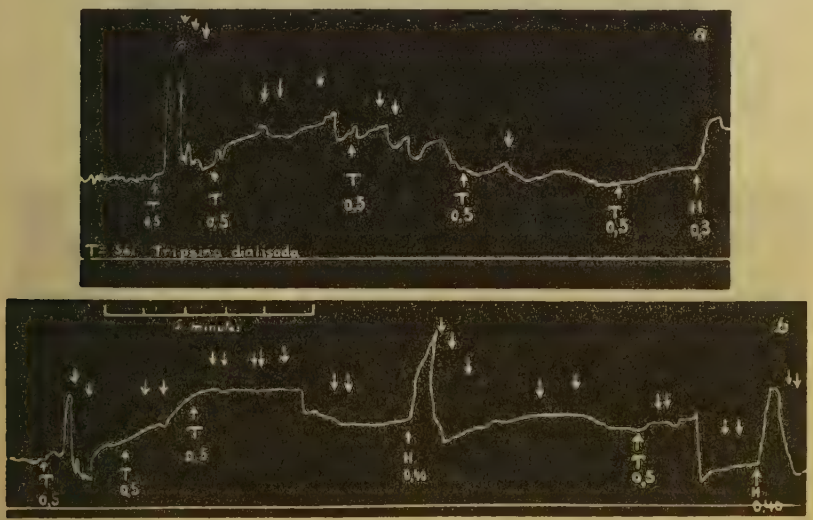


Fig. 5 *a* e *b* — Duas experiencias com fragmentos de ileo de duas cobaias diferentes. T = solução de tripsina dialisada (0,8 %). H = histamina a 1/1 milhão.

sivas de histamina. Ao fim de 3 a 4 adições, o musculo se mostra insensivel á mesma dose de tripsina, embóra continuando a reagir nitidamente á histamina.

2. Ação da tripsina sobre o utero isolado de cobaia

Na experiencia da fig. 6, utilizamos uma cobaia femea potente, de 405 gms. de peso e grandes cornos uterinos. A cobaia foi mantida cerca de 4 mêses afastada do macho e o seu utero *in vitro,* reagia com grande regularidade, equilibrado com um contra-peso de 2 gramas, fixo na alavanca.

A tripsina utilizada foi cuidadosamente dialisada durante 4 dias. Um extrato obtido pela técnica de Barsoum & Gaddum modificada por Code, nenhum efeito produziu sobre o mesmo utero (fig. 6). A reação á tripsina era além disso bem distinta da reação á histamina. Ao passo que esta se desencadeia instantaneamente, depois da adição da

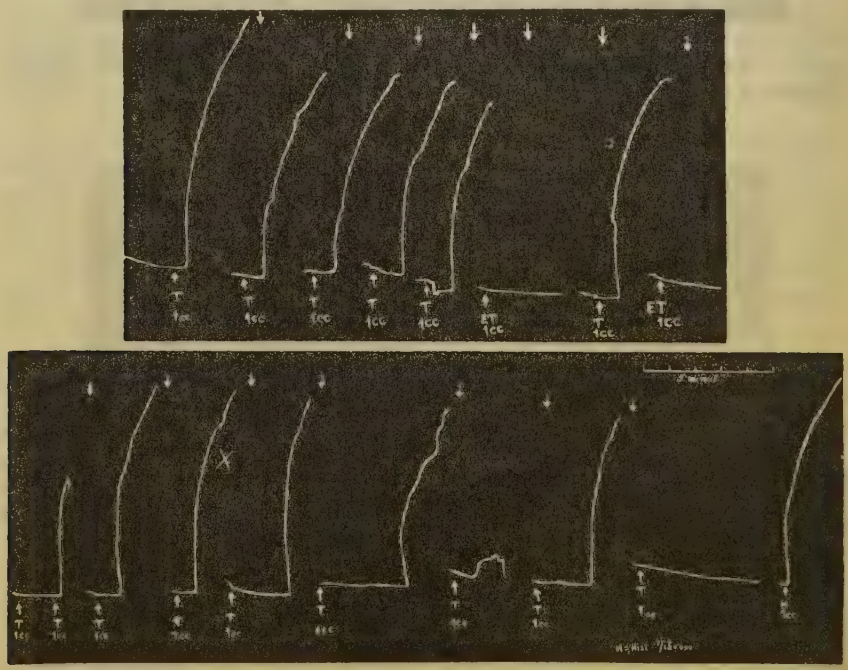


Fig. 6 — Ação da tripsina sobre o utero de cobaia. T = Solução a 0,8 % de tripsina dialisada. ET = Extrato da mesma solução de tripsina, obtido pelo metodo de Barsoum & Gaddum. H = sol. de histamina a 1/150.000. (O traçado inferior é a continuação do traçado superior).

histamina, praticamente sem tempo de latencia, a contração á tripsina era precedida de um longo tempo de latencia, que variou de alguns segundos a quasi 4 minutos. Conseguimos prolongar esse tempo de latencia, utilizando a seguinte técnica: depois da adição da dóse de tripsina habitual (1 cc.) e de registrada a contração, o cilindro era afastado e o musculo deixado em contato com a tripsina durante alguns minutos; em seguida o musculo era lavado com novo Ringer, o cilindro novamente colocado em posição de registro, e nova quantidade de tripsina (1 cc.) era adicionada. Esse metodo foi empregado a partir do momento marcado com um sinal X na figura 6. Póde-se vêr que daí por diante os tempos de latencia foram consideravelmente prolongados, mostrando-se finalmente o musculo completamente dessensibilizado á ultima adição de tripsina. Ignoramos se essa aparente dessensibilização era total, ou se apenas correspondia a um tempo latente mais demorado. Acreditamos que a explicação para esse longo tempo de latencia corresponde á lentidão com que se processa a digestão triptica, que prosegue atingindo novas camadas com libertação brusca de novas quantidades de histamina. Assim a dessensibilização total, absoluta, só seria obtida em seguida á libertação de toda a histamina ligada ao musculo.

3. Experiencias de perfusão do pulmão de cobaia, com soluções de tripsina

A suposição de que pequenas dóses de histamina possam ser libertadas pela digestão triptica dos musculos lisos utilizados nas experiencias anteriores, o que daria origem á contração do musculo, foi reforçada pelas experiencias referidas abaixo, em que se obteve a libertação de uma substancia excitante da musculatura lisa, muito provavelmente a histamina, pela perfusão de pulmões de cobaia com soluções de tripsina.

A figura 7 mostra a ação dos perfusatos do pulmão da cobaia IV, antes (P_1) e depois (P_2 e P_3) da adição de 2 cc. de uma solução a 2 % de tripsina.

A figura 8 mostra a dosagem da histamina nos perfusatos da cobaia V. A solução de tripsina utilizada foi uma solução a 1 % dialisada durante 4 dias, praticamente livre de histamina.

A figura 9 mostra o resumo das cinco experiencias de perfusão. A quantidade total de histamina libertada, em γ/minuto, é dada em ordenadas. As abcissas representam o tempo de duração da perfusão.

A figura 10 mostra comparativamente as quantidades de histamina libertadas nas experiencias de Feldberg & Kellaway (1937) com veneno de cobra, e nas nossas com soluções de tripsina. Na realidade

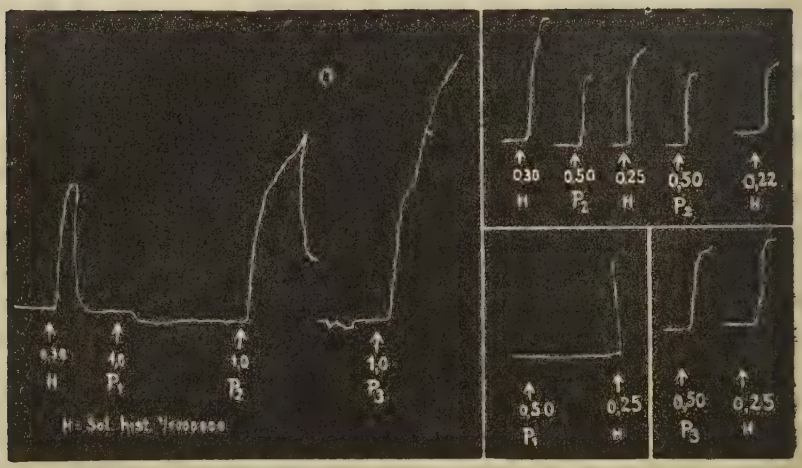


Fig. 7 — Ação sobre o intestino de cobaia dos extratos dos perfusatos do pulmão da cobaia IV. P_1 = 15 minutos de perfusão antes da adição de tripsina. P_2 e P_3 perfusatos de 20 minutos cada um, em seguida á adição de 2 cc. da solução de tripsina. H = Sol. de histamina a 1/1 milhão.

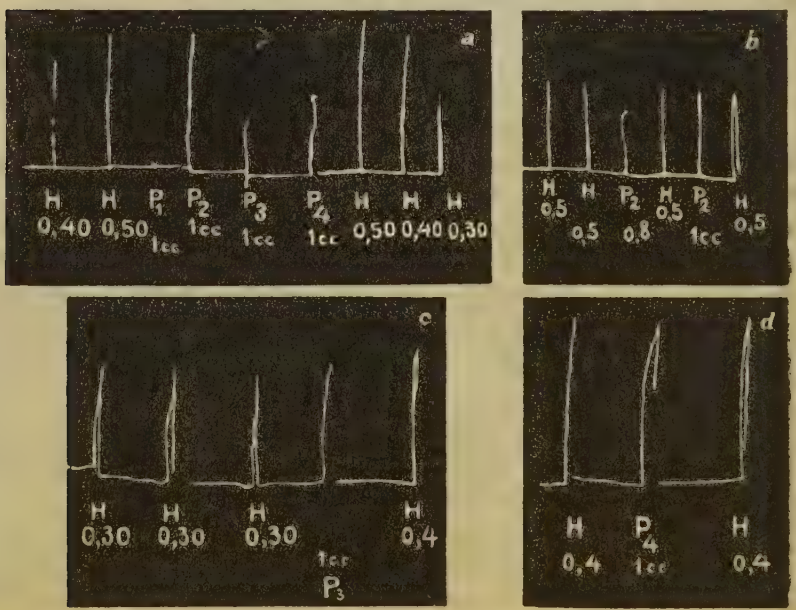


Fig. 8 *a*) — Ação dos perfusatos: P_1, antes da adição de tripsina; P_2, 29 minutos de perfusão depois da injeção de 2 cc. de tripsina; P_3, mais 25 minutos de perfusão; P_4, 30 minutos mais de perfusão depois de P_3. *b), c)* e *d)* — Dosagem da histamina nos perfusatos P_2, P_3 e P_4 (volume reduzido a 5 cc.).

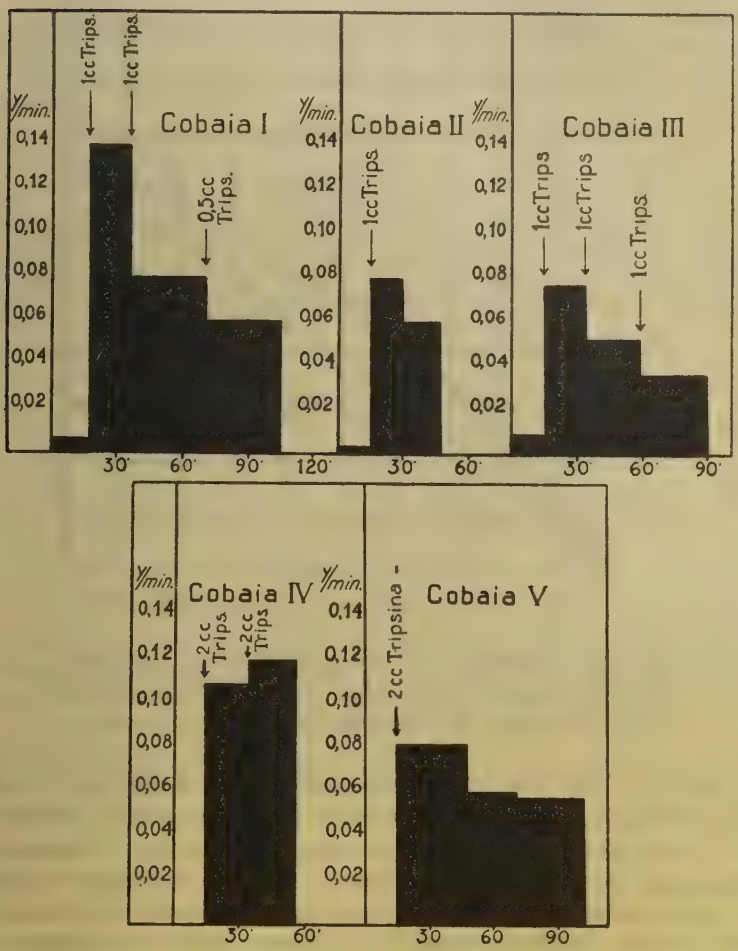


Fig. 9 — Grafico das quantidades de histamina libertadas pela perfusão de pulmão de 5 cobaias, com soluções de tripsina. As ordenadas representam as quantidades de histamina em γ, libertadas por minuto. As abcissas representam os tempos de perfusão. As areas escuras, as quantidades totais de histamina.

as experiencias dos autores citados foram feitas perfundindo apenas um dos pulmões. Nas nossas experiencias empregamos o pulmão total. Pelos graficos da figura 10, póde-se vêr que são da mesma ordem de grandeza as quantidades libertadas pela tripsina e pelo veneno de cobra.

Aspéto externo dos pulmões durante a perfusão: Ao fim de 20 a 40 minutos, eramos obrigados a interromper a respira-

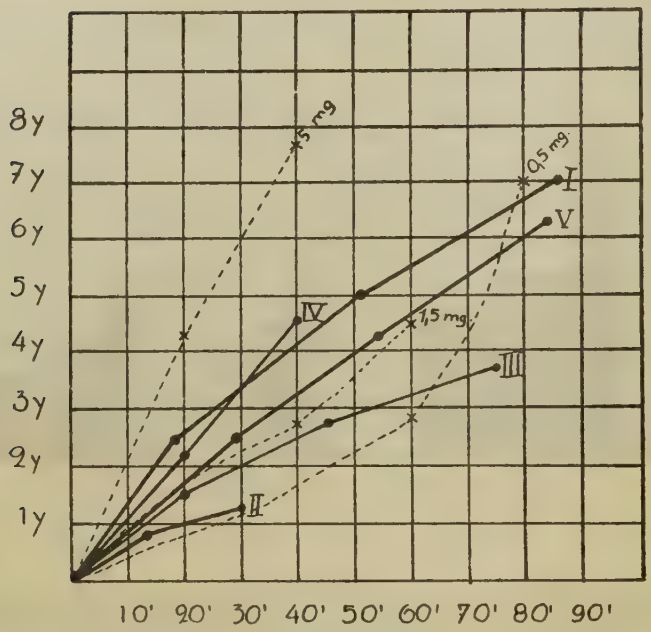


Fig. 10 — Representa, em negro, as quantidades de histamina libertadas nas 5 experiencias de perfusão de pulmão com tripsina. Os traços pontilhados representam as quantidades libertadas pela perfusão com veneno de cobra, segundo FELDBERG & KELLAWAY.

ção artificial. Os lobos pulmonares mostravam-se então quasi imobilizados, massiços, apresentando em certos pontos um aspéto vidrado.

Essas placas vidradas se tornavam cada vez mais extensas, em alguns casos tomando um lobo inteiro. Segundo FELDBERG & KELLAWAY esse aspéto é típico nas experiencias de perfusão com veneno de cobra. Ao fim de 40 a 50 minutos, pequenos orificios, por onde escapa o liquido de perfusão, aparecem na superficie do orgão.

Depois disso o orgão começa a apresentar sinais evidentes de digestão, e ás vezes um lobo inteiro, particularmente entre os superiores, aparece completamente digerido, o que nos obrigava a interromper a perfusão.

Algum tempo depois da injeção de tripsina, póde-se ver no liquido de perfusão um material pulverulento, sem estrutura, provavelmente correspondente á poeira retida na estrutura interna do pulmão, e que se liberta quando esta ultima é destruida pela digestão trip-

tica. Aspétos semelhantes foram descritos por FELDBERG & KELLAWAY (1937 *b*) para a perfusão do pulmão com o veneno de *Crotalus atrox*. A tabela 1 mostra o resumo das 5 experiencias de perfusão.

TABELA 1

Resumo dos protocolos das 5 experiencias de perfusão do pulmão com sols. de tripsina

N.º da cobaia	Peso da cobaia (em gms.)	Começo da perfusão	Perfusato antes da injeção de tripsina	1.º Perfusato depois da injeção de tripsina	2.º Perfusato depois da injeção de tripsina	3.º Perfusato depois da injeção de tripsina	Quantidade total de histamina libertada (em γ)
I	350	9h,30	10h, 0 - 10h,29	10h,47	11h,20	11h,55	7,0
II	540	9h,30	10h, 0 - 10h,15	10h,47	11h	11h,17	1,3
III	430	9h,30	10h, 0 - 10h,15	10h,35	11h	11h,30	3,75
IV	405	10h, 0	10h,15 - 10h,40	11h, 0	11h,20	—	4,6
V	320	9h,40	10h, 0 - 10h,16	10h,45	11h,10	11h,40	6,25

SUMARIO E CONCLUSÕES

1.º) Nas experiencias acima referidas mostramos que soluções de tripsina, mesmo suficientemente purificadas por dialise prolongada, exercem uma ação estimulante sobre a musculatura lisa do intestino. A ação se traduz por uma lenta elevação do tonus, que se desencadeia depois de um longo periodo de latencia e depois de lavagem com novo Ringer. A adição de novas dóses, depois da primeira contração, determina uma contração geralmente menos forte e precedida de um tempo de latencia mais prolongado. Finalmente o musculo se apresenta dessensibilizado. A adição de uma dóse mais forte é seguida de nova reação, e a dessensibilização se segue tambem para essa dóse. A semelhança do efeito produzido pela tripsina sobre a musculatura lisa, com o efeito produzido pelo veneno de cobra, sugere: a) que uma mesma explicação póde ser dada a um e outro fenomeno, isto é, uma libertação de uma substancia estimulante, na propria intimidade da massa muscular; lavagens repetidas com novo Ringer, produzem pequeno ou nenhum efeito sobre a manutenção daquele tonus elevado do intestino; b) que pelo menos uma parte dos efeitos observados por FELDBERG & KELLAWAY sobre a musculatura lisa do intestino, pela adição do veneno de cobra ao banho de Ringer, tem a sua origem na presença de fermentos proteoliticos, assinalada naquele veneno por numerosos pesquisadores (FLEXNER & NOGUCHI, 1902; NOC, 1904; HOUSSAY & NEGRETE, 1918; EAGLE, 1937, etc.).

Aperfeiçoando-se o metodo quanto á sensibilidade, diminuindo-se a capacidade da cuba, observa-se, logo em seguida á adição da tripsina, uma contração rapida, reversivel, precedida de um tempo latente menor. Nas experiencias das figs. 5 *a* e *b*, em que essa primeira contração se observa de maneira muito nitida, foi empregada uma tripsina dialisada durante 4 dias. Uma dosagem de histamina feita mediante extrações pela técnica de Code, revelou um equivalente maximo de 1/40 milhões. Ora, o intestino empregado era insensivel á adição de soluções tão diluidas de histamina. Póde-se admitir para explicar essa primeira contração, uma libertação de histamina dos tecidos envolventes do orgão. De fato novas adições de tripsina não reproduzem semelhante contração. Com os venenos de cobra observa-se tambem uma contração rapida, seguida entretanto de uma permanencia do tonus, sem que se observe uma volta deste ultimo ao valor habitual.

Evidentemente uma simples diferença de difusibilidade dos dois agentes, tripsina e veneno de cobra poderia explicar essa discrepancia.

2.º) Observamos ainda que a adição de uma solução de tripsina dialisada, ao banho de Ringer contendo um fragmento de utero de cobaia, é acompanhada de contrações rapidas, precedidas de um tempo de latencia que variou de alguns segundos a alguns minutos.

Foi-nos possivel prolongar esse tempo de latencia, deixando em contato, durante 2 a 3 minutos, no banho de Ringer, depois da contração, a tripsina que tinha sido adicionada. Repetindo varias vezes a mesma operação, foi possivel dessensibilizar o utero para uma nova adição da mesma dóse do fermento, embóra mantendo-se o utero ainda sensivel á histamina. A reação a esta ultima era ainda a do tipo habitual, desencadeando-se imediatamente depois da adição da histamina, praticamente sem tempo de latencia. A explicação poderia ser a mesma admitida quanto á ação do veneno de cobra nas mesmas condições: uma libertação de uma substancia estimulante, provavelmente histamina, na propria intimidade da massa muscular. A solução de tripsina utilizada nas experiencias com utero de cobaia foi a mesma solução dialisada durante 4 dias e praticamente livre de histamina. A figura 6 mostra o efeito negativo da adição do extrato, obtido pela técnica de Code, sobre o mesmo utero utilizado na experiencia.

3.º) Como vimos anteriormente, tem sido muito discutida a questão de poder ser ou não a histamina, o fator responsavel pela ação do veneno de cobra sobre o utero e intestino isolados de cobaia. Ora, a demonstração feita por Feldberg & Kellaway (1937 *b*) de uma libertação de histamina pela perfusão do pulmão com soluções de vene-

no, permite atalhar a questão. Evidentemente se fica demonstrado que o veneno é capaz de libertar histamina dos tecidos, é fóra de duvida que pelo menos em parte, os seus efeitos sobre o musculo liso pódem ser explicados por uma libertação daquele principio estimulante, normalmente ligado aos coloides celulares do intestino e utero.

Ora, a explicação de que tambem no caso da tripsina, a sua ação sobre a musculatura lisa seria a consequencia de uma libertação de histamina na propria intimidade da massa muscular, repousa no fato por nós observado, de que aquele agente proteolitico é capaz de libertar dóses apreciaveis de histamina de pulmões de cobaia, o que será discutido mais adiante.

A impossibilidade de demonstrar diretamente sobre o musculo isolado, se é ou não histamina o agente responsavel pela ação estimulante, provém da ignorancia atual de um reagente especifico, capaz de inibir de maneira definida a ação da histamina. Todos os tests propostos (aldeído formico, cloralose, etc.) têm-se mostrado mais ou menos inespecificos, agindo antes sobre a propria musculatura lisa. Recentemente Garan (1938) mostrou que a histamina é inibida pelo borbulhamento de CO_2 no banho de Ringer contendo o intestino isolado de cobaia. Faltam entretanto dados precisos sobre a especificidade deste ultimo metodo.

4.º) A perfusão do pulmão de 5 cobaias com soluções de tripsina de teôr variavel, resultou numa definida libertação de uma substancia estimulante da musculatura lisa do intestino e que, dosada como histamina, mostrou um teôr comparavel aos obtidos por Feldberg & Kellaway (1937 *b*) com o veneno de cobra.

Em 1919, Abel & Kubota tinham mostrado que dóses apreciaveis de histamina podiam ser geradas na hidrolise, pela ebulição com HCl concentrado, de diversas albuminas purificadas, como a caseina e a edestina. Procuramos verificar se a digestão triptica da caseina era acompanhada de libertação de histamina e os resultados negativos a que chegamos mostram que embóra a histamina possa ser libertada da ligação frouxa com os coloides celulares, sob a ação da tripsina, como ficou demonstrado nas experiencias de perfusão do pulmão de cobaia, os produtos de degradação enzimatica de uma proteina, como a caseina, só como impureza, devem conter histamina. Os fatos que verificamos acima afastam de maneira definitiva a objeção de Dale (1929) de que nenhuma evidencia experimental sugeria uma libertação de histamina na clivagem de proteinas por um agente triptico. A digestação triptica de um orgão como o pulmão de cobaia, rico em histamina, é acompanhada de uma definida libertação de histamina.

ACTION OF TRYPSIN ON SMOOTH MUSCLE. LIBERATION OF HISTAMINE FROM THE PERFUSED GUINEA-PIG LUNG BY TRYPSIN.

Abstract

1) This paper deals with the action of trypsin on isolated smooth muscle of the guinea-pig, as well as with the liberation of histamine from the perfused guinea-pig lung by solutions of trypsin.

2) We employed solutions in saline of a commercial preparation of trypsin (Schering). The employed solutions were always very active and digested, in a few minutes, 5 cc. of a 0,1 % casein solution in 0,1 % $Na_2 CO_3$ In some of the experiments, solutions of trypsin dialyzed 2 to 4 days against distilled water at 0 were tried. Extracts of that dialyzed trypsin solution were obtained by CODE'S *technique and have shown a maximum amount of histamine of 1/40 millions.*

3) In the experiments of perfusion of the guinea-pig lungs, the device described by BARTOSCH ET AL. *(1932 b) was employed, with slight alterations. The lung was dissected from the thorax and placed on a specially shaped sheet of celluloid. A cannula was tied into the pulmonary artery and the left auricle was cut off. The perfusion fluid collected on the sheet of celluloid, was conducted by a rubber tube into graduated flasks. Immediately after the lung was placed on the celluloid sheet, the artificial respiration started by a cannula tied in the trachea. The estimation of the histamine equivalents in the perfusates, was made by* GUGGENHEIM & LÖFFLER'S *technique, the guinea-pig ileum being used for the test. The extracts of the perfusates were obtained by* CODE'S *method. In order to avoid the increasing of the salts concentration which would interfere with the reaction of the guinea-pig ileum to histamine, we introduced a slight modification in* CODE'S *method: The boiling with concentrated HCl is carried out until the crystallization of the salts begins. The water is also carefully evaporated to almost complete dryness. A few cc. of 96 % alcool are then added. Filtration allows a complete removal of the precipitated salts. Then the filtrate was dried in vacuo and the residue dissolved in 5 cc. of saline. The removal of the excess of salts allowed a strong reduction in the final volume of the extract (40 cc. of perfusate to 5 cc. of extract) without interference with the reaction of the guinea-pig intestine to histamine.*

4) Trypsin in proper concentrations has a strong stimulant action upon the smooth muscle of the guinea-pig intestine in vitro. The type of reaction with the guinea-pig's intestine is well shown in Figs. 2, 3 and 4. After the addition of the trypsin to the bath (20 cc.) and after a variable latent interval, a slow contraction starts. Repeated

changing of the Ringer solution had only a slight effect. Addition of new doses of trypsin after relaxation, is followed by dimisished responses and a longer latent interval. After some additions, the muscle was desensitized to these doses of trypsin. The addition of larger doses (Fig. 3) was followed by a slight contraction preceded by a longer latent interval. Finally the muscle was desensitized even to this larger dose of trypsin. With a bath containing only 7 cc. of Ringer (Fig. 5 a and b) we observed a rapid contraction starting a few seconds after the addition of trypsin, reversible by changing the Ringer solution and followed by the typical slow contraction. Renewed additions of trypsin never reproduced that first, immediate contraction, the muscle appearing completely desensitized, as can be shown in figs. 5 a and b. In these last experiments we used a solution of trypsin dialyzed 4 days against distilled water at 0°. Extracts obtained with CODE'S *technique were pratically histamine free.*

The liberation of a stimulant substance in the external tissues of the organ could explain this immediate, reversible, histamine-like contraction.

5) Trypsin, sufficiently purified by dialysis exerts a powerful stimulant action upon the plain muscle of the guinea-pig uterus in vitro. The experiment referred to (fig. 6) was performed with a uterine horn (5 cm.) of a grown guinea-pig (410 gms.) which had been separated from the males, during 4 months. The addition of trypsin to the bath caused a maximum contraction starting after a latent interval, which varied from a few seconds to 3 or 4 minutes. We were able of lengthening this latent interval, by employing the following technique: After the contraction, the drum was held off and the trypsin left in contact with the organ during 2 or 3 minutes. After this time the Ringer was changed, the drum placed in recording position and then 1 cc. of the trypsin solution newly added. As we can see (fig. 6) the latent interval which was only of some seconds at the beginning of the experiment, attained, by this treatment, the volue of 3 to 4 minutes (after the signal X in the figure). Finally the muscle was completely desensitized, while showing a definite sensitivity to histamine.

6) Experiments of perfusion of the guinea-pig lung with trypsin resulted in a definite liberation of histamine. The total histamine output from the perfused lungs oscillated between 1.3 γ to 7 γ (Figs. 9 and 10. Table 1). After 20 to 30 minutes of perfusion, the lungs showed a strong swelling and areas of a glassy appearance gradually extended over the surface of the organ. After a certain time, holes appeared in the surface of the lung through which the perfusion fluid, as well as air bubbles of the artificial respiration, escaped. Evident

signs of digestion of large regions of the pulmonary lobes made impossible the proceeding of the experiment. Particles with a dust-like appearance were found in the last perfusates. The addition of the trichloracetic acid to the last perfusates resulted only in a slight turbidness, indicating that almost all protein was digested.

7) The hypothesis of a liberation of histamine, by the enzymatic cleavage of the proteins of the tissues, in order to explain the stimulant action of the trypsin upon the smooth muscles, is discussed.

8) The parallelism between the effects produced by trypsin and snake venoms upon the plain muscles is also discussed. A certain relationship between the proteolytic activity of the snake venoms and their capacity for eliciting contractions on the smooth muscles and for liberating histamine from the perfused lungs is suggested.

BIBLIOGRAFIA

Abel, J. J. & S. Kubota — 1919 — On the presence of histamine (B-iminazolylethylamine) in the hypophysis cerebri and other tissues of the body and its occurrence among the hydrolytic decomposition products of Proteins. *Journ. of Pharm. and Exp. Ther.*, **13**, 243-300.

Bartosch, R., W. Feldberg & E. Nagel — 1932 *a* — Das Freiwerden eines histaminähnlichen Stoffes bei der Anaphylaxie des Meerschweinchens. *Pflüger's Archiv*, **230**, 129-153.

Bartosch, R., W. Feldberg & E. Nagel — 1932 *b* — Die Übertragung der Anaphylaktischen Lungenstarre auf die Lunge normaler Meerschweinchen. *Pflüger's Archiv*, **230**, 674-679.

Bartosch, R. — 1935 — Über die Herkunft des Histamins bei der Anaphylaxie des Meerschweinchens. *Klin. Woch.*, **14**, 307-308.

Code, C. F. — 1937 — The quantitative estimation of histamine in the blood. *Journ. of Phys.*, **89**, 257-268.

Dale, H. H. — 1929 — Croonian lectures (III) on some chemical factors in the control of the circulation. *Lancet*, **216**, 1285-1290.

Dragstedt, C. A., F. B. Mead and S. W. Eyer. — 1938 — Role of histamine in Circulatory effects of Rattlesnake venom. *Proc. of the Soc. f. Exp. Biol. and Med.*, **37**, 709-710.

Essex, H. E. & J. Markowitz — 1930 *a* — The physiologic action of Rattlesnake venom (Crotalin) I. Effect on blood presure: Symptoms and Post-mortem observation. *Am. Journ. of Physiol.*, **92**, 317-327.

Essex, H. E. & J. Markowitz — 1930 *b* — The physiologic action of Rattlesnake venom (Crotalin) II. The effect of crotalin on surviving organs. *Am. Journ. of Phys.*, **92**, 329-334.

Essex, H. E. & J. Markowitz — 1930 *c* — The physiologic action of Rattlesnake venom (Crotalin) VII. The similarity of Crotalin shock and Anaphylactic Shock. *Am. Journ. of Physiol.*, **92**, 698-704.

Essex, H. E. & J. Markowitz — 1930 *d* — The physiologic action of Rattlesnake venom (Crotalin) VIII. A comparison of the physiol. action of Crotalin and Histamine. *Am. Journ. of Physiol.*, **92**, 705-706.

FELDBERG, W. & C. H. KELLAWAY — 1937 *a* — The circulatory and pulmonary effects of the venom of the Australian Copperhead (Denisonia superba). *Aust. Journ. of Exp. Biol. and Med. Science,* **15**, 81-95.

FELDBERG, W. & C. H. KELLAWAY — 1937 *b* — Liberation of histamine from the perfused lung by snake venom. *Journ. of Physiol.*, **90**, 257-279.

FELDBERG, W. & C. H. KELLAWAY — 1937 *c* — Circulatory effects of the venom of the indian cobra (Naia naia) in dogs. *Aust. Journ. of Exp. Biol. and Med. Science,* **15**, 441-460.

GARAN, R. S. — 1938 — Inaktivierung von Histamin durch Kohlensäure. *Arch. f. Exp. Path. n. Pharm.*, **188**, 247-249.

KELLAWAY, C. H. — 1929 — The Action of the Australian snake venoms on plain muscle. *Brit. Journ. of Exp. Path.*, **10**, 281-303.

KELLAWAY, C. H. — 1937 *a* — Snake venoms. I. Their Constitution and Therapeutic Applications. *Bull. of the Johns Hopkins Hospital.* **60**, 1-17.

KELLAWAY, C. H. — 1937 *b* — Snake venoms II. Their peripheral action. *Bull. of the Johns Hopkins Hospital.* **60**, 18-39.

RICHTER, R. — 1938 — Über den Zusammenhang zwischen Toxität und Darmwirkung bei Klapperschlangen- und Bienengift. *Arch. f. Exp. Path. u. Pharm.*, **189**, 172-187.

ROCHA E SILVA, M. — 1938 — Methodo de dosagem da histamina. *Acta Medica*, **2**, 40-50.

SLOTTA, K. H. & H. FRAENKEL-CONRAT — 1938 — The Active Proteins from Rattlesnake venom. *Nature,* **142**, 213.

———o———

Vol. 9 — Art. 17 Novembro de 1938

A HIPOFISE E SUA AÇÃO NAS GONADAS DOS PEIXES NEOTROPICOS

POR

P. de Azevedo e L. Canale

Da Comissão Técnica de Piscicultura do Nordeste e do Instituto Biologico de S. Paulo

Com 3 figuras no texto e estampa 16

A hipofise só aparece na escala zoologica a partir dos *Craneota*. Nos peixes, é admiravel a proteção com que se cercou essa glandula, em algumas especies, principalmente se levarmos em conta que esses animais são considerados como os vertebrados mais inferiores. Ligada á base do cerebro pela haste pituitaria, essa formação impar se encontra alojada numa escavação da sela turcica do esfenoide. Nos Nematognathas, a loja do esfenoide, onde se encontra a hipofise, é pouco profunda, ficando essa glandula como que solta, de tal modo que, ao ser rebatido o cerebro, ela o acompanha, ficando completamente exposta (figs. 1 e 2). Isso não se observa nos Characideos em que, além da loja ser mais profunda, a hipofise é relativamente um pouco maior e se acha revestida por uma membrana protetora, que dá passagem somente á haste pituitaria, de modo que, nesses peixes, ela só pode ser retirada depois de rôta essa membrana. O tamanho da glandula é variavel, dependendo muito do desenvolvimento da especie. O seu peso, em peixes de 3 a 5 quilos e de 50 a 60 cms. de comprimento, é de 7 a 9 mgs. aproximadamente. Macroscopicamente pode-se distinguir na hipofise dos peixes dois lóbos: um superior, de côr esbranquiçada, outro inferior, mais escuro e, entre os dois, o tronco fibrilar. Essa diferenciação é menos nitida nos peixes de couro do que nos de escamas e a hipofise nestes é sempre mais sanguinea do que naqueles, principalmente antes e durante a quadra da desova.

No esquema apresentado (fig. 3), vê-se que o lóbo anterior, além de ocupar uma posição antes superior do que verdadeiramente anterior, como nos mamiferos, envolve a parte nervosa, e que esta penetra na porção intermediaria, ficando em intimo contato com ela, o que tambem se observa entre os dois lóbos: o superior e o inferior. Do exposto, conclue-se que separar essas diversas porções da hipofise, no animal vivo, é, com rigor, impossivel; no material fresco, não será mais facil, dada a intima relação que existe entre aquelas porções.

A' semelhança do que acontece nos vertebrados superiores, distinguem-se na hipofise dos peixes tres porções de aspeto histologico diferente: a primeira é constituida de celulas acidofilas grandes, celulas

Fig. 1 — Cabeça de *Nematognatha* com a massa encefalica exposta.

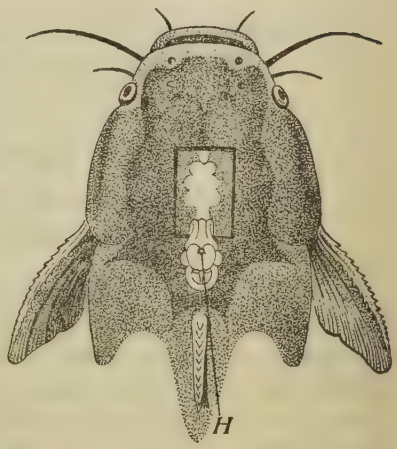


Fig. 2 — Encefalo rebatido para traz, trazendo a hipofise *(H)* presa á sua base.

cromofobas vacuolizadas e raros elementos linfocitoides; a segunda, de celulas acidofilas pequenas, celulas basofilas tambem pequenas, filetes fibrilares e elementos linfocitoides; e a terceira, em forma de pediculo e disposta entre as duas porções acima descritas, apresenta septos fibrilares e celulas cromofobas pequenas (estampa 16). Para não fugir á nomenclatura estabelecida para as diversas porções da hipofise nos mamiferos, tambem chamaremos aqui, á primeira porção, «*pars glandularis*» ou lóbo anterior; á segunda, «*pars juxtaneuralis*» ou parte intermediaria; e finalmente á ultima, «*pars infundibularis*» ou nervosa.

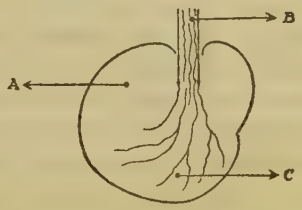


Fig. 3 — *A* - Lobo anterior. *B* - Parte nervosa. *C* - Parte intermediaria.

As diferentes porções da hipofise têm origem embriologica diversa: a parte nervosa deriva-se de uma invaginação do ectoderma neural; a parte glandular e a intermediaria provêm de uma invaginação do ectoderma bucal.

A fisiologia da hipofise é um dos mais interessantes e complicados capitulos da endocrinologia. Modernamente, muita luz se tem feito neste campo da fisiologia, porém um sem numero de questões ainda se encontram a espera de solução. O material de experimentação tem constado sempre dos seguintes animais, em ordem decrescente de emprego: mamiferos, batraquios, aves e peixes. A natureza do presente trabalho não comporta considerações sobre a diversidade de ação dos diferentes hormonios hipofisarios. Esta contribuição será mais tecnica do que cientifica, pois partindo dos conhecimentos modernos ligados á ação dos hormonios hipofisarios gonadoestimulantes e em continuação ás experiencias iniciadas por R. von Ihering e seus colaboradores, procuraremos demonstrar qual o metodo mais pratico e seguro para se provocar artificialmente a reprodução em animais de procriação periodica, como sejam os peixes.

DESENVOLVIMENTO DAS GONADAS

O desenvolvimento das gonadas nos peixes é condicionado por fatores externos, proprios aos ambientes onde vivem. Autores ha, como Wunder, que em muitos casos apontam o fator alimentação como responsavel pela falta de desenvolvimento das gonadas. A' semelhança do que se passa em mamiferos de ovulação espontanea, em que os ovarios apresentam foliculos maduros sem que venham a romper-se senão depois da descarga hormonal postcoitum, tambem nos peixes os fatores exogenos, segundo o nosso modo de pensar, atuam sobre um centro nervoso e a essa excitação segue-se uma descarga de hormonios do lóbo anterior, capaz de determinar a maturação dos ovulos. As seguintes observações parecem comprovar o que acima aventamos. Em um açude proximo de Campina Grande, Paraíba, por falta de chuvas, as curimatãs *(Prochilodus argenteus)* não desovaram na época propria, Março de 1934; oito mezes depois, Novembro de 1934, autopsiando varios exemplares retirados desse açude, constatamos a presença de ovarios um pouco diminuidos de peso, mas repletos de ovulos imaturos. Alguns exemplares de saguirú *(Curimatus elegans)*, retirados de um lote que devia desovar entre Abril e Maio de 1936, foram retidos em aquarios no nosso laboratorio de Fortaleza, Ceará, afim de observarmos quais as transformações que se processariam nas suas gonadas; autopsiados em Agosto do mesmo ano, pudemos constatar que se encontravam ainda ovados. A mesma observação foi repetida com um *Leporinus*, tambem do Nordeste e os resultados obtidos foram identicos aos anteriores. Von Ihering, trabalhando, em S. Paulo, com dourados *(Salminus maxillosus)*, pôde constatar que as femeas desta especie ainda se encontravam ovadas, após seis anos de cativeiro.

Da mesma forma que acontece em certos mamiferos em que os foliculos maduros não se rompem, por falta da ação hormonal, acabando em atresia, finda a época da reprodução, tambem constatamos uma verdadeira involução em femeas de *Serrasalmoninae, Trachycoristinae,* etc., que não desovaram na quadra propicia.

Nos peixes nacionais, a maturação dos ovulos ou se processa rapidamente, de uma só vez: maturação total, que condiciona uma desova tambem total, propria dos *Prochilodinae, Anostomatinae, Curimatinae, Plecostominae, Trachycoristinae,* etc., ou vae-se fazendo lentamente, por etapas: maturação parcial, condicionando tambem uma desova parcial, comum aos *Tetragonopterinae, Erythrininae,* etc. No primeiro caso, é nosso ponto de vista, os agentes exogenos provocam uma descarga de hormonios capaz de produzir o amadurecimento total dos ovulos; no segundo, em virtude do desenvolvimento parcial das gonadas, a ação dos hormonios se faz sentir mais sobre a porção do ovario que apresenta ovulos bem desenvolvidos (semimaduros), provocando a maturação unicamente dessa parcela.

Ás transformações que se operam nos ovarios dos peixes, condicionadas por essas descargas dos hormonios do lóbo anterior da hipofise, correspondem outras analogas, observadas nos testiculos. Assim, nos Tetragonopterineos, que apresentam maturação parcial dos ovulos, pudemos verificar que a essas fases de maturação corresponde o despertar da vitalidade dos espermatozoides, até então inertes, aliado a uma maior fluidez do esperma. Examinando as gonadas de um lote de *Astyanax bimaculatus,* pescado em um açude de Campina Grande, Paraíba, entre 9 e 15 de Março de 1935, constatamos a inercia absoluta dos espermatozoides. Durante a noite desse mesmo dia, houve uma grande chuva, que provocou verdadeira enchente. Na madrugada seguinte, retiramos, do mesmo açude de onde proviera o material anterior, alguns exemplares daquela especie, cujas gonadas, além da franca fluidez de esperma, apresentavam espermatozoides com notavel vitalidade, o que se pôde verificar pela sua prolongada movimentação.

AÇÃO DA HIPOFISE

Hipofise fresca de peixe sobre peixes juvenis: — As primeiras experiencias neste sentido, após as tentativas de R. von Ihering em S. Paulo, foram feitas pelo Dr. D. M. Cardoso, juntamente com um de nós, por ocasião da sua estadia em Jatobá, Pernambuco, como membro temporario da Comissão Tecnica de Piscicultura do Nordeste. Procuraremos apresentar aqui, de uma maneira muito sucinta, as conclusões a que chegou aquele fisiologista patricio, para

o que nos utilizaremos das tabelas e dados contidos no seu relatorio sobre os trabalhos em Jatobá, apresentado ao chefe da C. T. P., em Maio de 1934.

De inicio, verificou D. CARDOSO que existe uma relação (R) entre o peso dos órgãos sexuais e o comprimento dos peixes. Foram examinados cerca de 250 exemplares de mandís *(Pimelodus clarias)* e bozós *(Franciscodoras marmoratus)* de diferentes tamanhos, como mostram as tabelas seguintes.

Pela tabela 1, podemos observar que o desenvolvimento das gonadas nos bozós, peixes que alcançam no maximo 24 cms., sofre um brusco impulso quando o animal atinge o tamanho de 19 cms. mais ou menos. Acreditamos, com CARDOSO, que a esse tamanho corresponda, nos bozós, a fase da puberdade. Infelizmente os dados relativos aos mandís, tabela 2, peixes que alcançam um desenvolvimento maximo de 50 cms., não mostram a que tamanho corresponde a puberdade nessa especie.

Para se demonstrar a ação estimulante dos hormonios hipofisarios sobre as gonadas dos peixes, foram escolhidos tres lotes que, mantidos em viveiros, diariamente recebiam certa dose de hipofise fresca de peixe, sob a forma de injeção intramuscular. O 1.º lote, constituido de bozós (*), recebeu diariamente, 4 hipofises durante 18 dias, perfazendo um total de 72 hipofises, pesando 65 mgs. Autopsiados esses peixes, verificou-se, nas femeas, um aumento das gonadas, de 165 %, em relação aos testemunhas; dos machos, apenas um resistiu ao tratamento até o fim, e não obstante o seu estado lastimavel, pois se apresentava muito ferido e com sinais evidentes de grande sofrimento, ainda assim mostrou um aumento de 16 %. O 2.º lote, constante de mandís, foi injetado diariamente com 8 hipofises, pelo espaço de 13 dias, recebendo, pois, cada exemplar, um total de 104 hipofises, pesando 94 mgs. Esse lote, infelizmente constituido só por machos, apresentou um aumento de 310 %. O 3.º lote era composto de bozós que receberam 8 hipofises por dia, durante 10 dias, num total de 80 hipofises, pesando 72 mgs. Desse lote, as femeas apresentaram um aumento de 370 % e o unico macho restante, tambem muito ferido, mostrou um aumento de 60 %.

Conquanto os ambientes onde foram retidos esses peixes não tivessem sido os mais adequados á sua vida, o que certamente muito influiu nos resultados finais das experiencias, ainda assim os dados obtidos evidenciam claramente a ação dos hormonios hipofisarios no desenvolvimento das gonadas de peixes juvenis.

(*) Ao se referir a estas experiencias (bibl. 3), CARDOSO deixou de assinalar que o lote n.º 1 era constituido de bozós *(Franciscodoras marmoratus)*.

TABELA 1

BOZÓ

Machos *Franciscodoras marmoratus* Femeas

Comprimento em centimetros	Valores de R	R média	Comprimento em centimetros	Valores de R	R média
15	0,16 0,20 0,20 0,13 0,14 0,20 0,16 0,13 0,13	0,16	14	0,28 0,25 0,24	0,25
16	0,13 0,21 0,12 0,18 0,12 0,18 0,18 0,21 0,18 0,21	0,17	15	0,13 0,36 0,13 0,33 0,36 0,26 0,33	0,27
17	0,29 0,20 0,17 0,23 0,29	0,23	16	0,31 0,25 0,62 0,18 0,28	0,32
18	0,27 0,16 0,22 0,61 0,38 0,81 0,22 0,11 0,55 0,11	0,32	17	0,48 0,62 0,64 0,47 0,47	0,53
19	0,42 0,26 0,31 0,26 0,34 1,05 0,36 0,51 0,30	0,40	18	0,38 0,38 0,72 1,00 0,77	0,65
20	1,95 1,30 2,00 0,90 3,60 0,10 0,30	1,45	19	0,57 1,69 0,68 0,76 1,23 1,36	1,04
21	0,28 0,71 3,09 0,61 7,52	2,44	20	0,65 3,02 1,55 1,55 1,90 2,20	1,81
23	3,26	3,26	21	2,23 2,61 1,90 4,14 2,85	2,74
			22	1,95 6,36 3,40 3,81 2,40	3,58
			23	4,40 15,47 4,08	7,9

TABELA 2

MANDÍS

Pimelodus clarias

Machos			Femeas		
Comprimento (em cms.)	Valores de R	R média	Comprimento (em cms.)	Valores de R	R média
15	0,26 0,13 0,33 0,20 0,13	0,21	15	0,13 0,13 0,46 0,90 0,40	0,40
16	0,18 0,15 0,43 0,18 0,21	0,23	16	1,62 1,06 1,12 1,25 0,87	1,18
17	0,41 0,23 0,29 0,11 0,16	0,24	17 e 18	0,23 1,78 1,94 2,16 0,55 1,05	1,28
18	0,16 0,27 0,26 0,22 0,27	0,24	19	1,36 0,89 1,90 2,15 1,69	1,59
19	0,14 0,36 0,26 0,33 0,25 0,41 0,47	0,31	20	1,30 1,45 1,51 1,55 1,55	1,87
20	0,40 0,50 0,35 0,50 0,50 0,34 0,25 0,17 0,35	0,37	22	2,50 3,36 3,72 2,59 3,27	3,08
21	0,28 0,33 0,38 0,38 0,50	0,37	27	3,10 3,40 3,70 4,60 1,37	3,23
22 23	0,31 0,39 0,68 0,29 0,22 0,39 0,50 0,21 0,44 0,30 0,77	0,39			
24	0,33 0,62	0,47	34	3,23 3,00	3,11

Hipofise de peixe sobre peixes ovados: — E' possivel obter a maturação ovular, tal qual se obtem o desenvolvimento das gonadas antes da época natural, desde que se lance no sistema circulatorio do peixe certa quantidade de hormonios gonadoestimulantes. Dessa forma, a dose de hormonios lançada artificialmente no sangue produziria efeitos identicos aos obtidos pela dóse que mais tarde será fornecida diretamente pela hipofise do proprio peixe. Os resultados das nossas experiencias confirmam exatamente essa conclusão teorica.

Dispomos de tão grande numero de experiencias nesse sentido, que seria fastidiosa a citação de todas elas. Abstração feita das experiencias preliminares, em que obtinhamos resultados parciais, ou por pequenas falhas técnicas, ou porque não dispuzessemos naquela época de ambiente adequado á vida dos animais em experiencia, passaremos a relatar as conclusões mais interessantes a que pudemos chegar; e antes de terminar este capitulo, transcrevemos algumas hipofisações executadas em diversas especies de peixes.

Os efeitos dos hormonios hipofisarios sobre peixes que apresentam suas gonadas mais ou menos preparadas para desova natural, traduzem-se por modificações morfologicas e funcionais dos orgãos genitais e por fenomenos de excitação sexual.

Logo após as injeções, os casais sofrem uma depressão no seu estado geral, que se traduz por um periodo de quasi imobilidade, durante o qual ha uma aceleração dos movimentos respiratorios; a essa fase segue-se um periodo de acalmia, mais pronunciado na femea do que no macho; logo após esta fase, surge a excitação geral que precede de 1 a 2 horas o inicio da desova. Durante esse periodo de excitação, os machos de algumas especies, ao perseguir as femeas, emitem ruidos surdos e roucos, proprios do Prochilodineos e estridentes, semelhantes ao coaxar da rã, nos Curimatineos. Algumas vezes as proprias femeas provocam os machos e não foram raras as ocasiões em que observamos dois machos perseguindo a mesma femea. A excitação nos machos é muito mais pronunciada do que nas femeas e quando estas persistem em evital-os, talvez por ainda não estarem possuidas da excitação necessaria para a desova, os machos dão-lhes verdadeiras cabeçadas, procurando mesmo mordel-as. O maximo da excitação provocada pelos hormonios hipofisarios pode ser observado, nos Tetragonopterineos, Curimatineos, etc., na fase dos chamados «carrousseis», que precedem de alguns minutos ($^1/_2$ hora) ás desovas e que consistem no seguinte: machos e femeas acasalados ou, ás vezes, em grupos de dois machos e uma femea, nadam rapidamente descrevendo um numero variavel de circulos concentricos, até que, no auge da excitação, atingem, em espiral, a superficie da agua e aí, concomitante-

mente a femea lança um jacto de ovulos e o macho, ao seu lado, um jacto de esperma.

O *Prochilodus argenteus*, quando desova em aquarios, sob a ação de hipofise, comporta-se mais ou menos como os Curimatineos e Tetragonopterineos, não obstante o seu grande porte. Nos peixes de couro *(Pimelodella lateristriga* e *Rhamdia quelen)*, nos Erythrinineos, etc., a excitação sexual não é tão nitida, pois tais peixes desovam sem fazer os «carrousseis».

As modificações morfologicas e funcionais das gonadas se acentuam á medida que se intensifica a excitação.

Nas femeas, o aumento dos ovarios é apreciavel, externamente, pelo abaulamento do ventre e em virtude da distensão das paredes abdominais, as escamas que as recobrem ficam bem destacadas umas das outras. Essa modificação pode ser mais bem anotada, medindo-se a circunferencia do corpo, na altura do ventre, antes e depois da injeção de hipofise (tabela 3).

TABELA 3

Especie	Sexo	Peso	Comprimento	Circunferencia abdominal antes da injeção	Circunferencia abdominal depois da injeção	Aumento
P. argenteus .	♀	570 grs.	285 mm.	230 mm.	249 mm.	19 mm.
» »	♀	650 grs.	310 mm.	216 mm.	230 mm.	14 mm.
Sch. vittatus .	♀	415 grs.	288 mm.	191 mm.	199 mm.	8 mm.
» »	♀	600 grs.	300 mm.	220 mm.	227 mm.	7 mm.
» »	♀	510 grs.	279 mm.	195 mm.	202 mm.	7 mm.
» »	♀	660 grs.	310 mm.	201 mm.	207 mm.	6 mm.

Internamente, os ovarios apresentam-se intensamente vascularisados, túrgidos, mostrando os ovulos aumentados de volume e modificados no seu colorido e aspéto. O trato genital fica hiperemiado e os ovulos flúem facilmente, pela simples pressão no ventre do peixe.

Nos machos, as modificações externas são menos evidentes. Internamente nota-se hiperemia do aparelho genital e ligeiro aumento relativo das gonadas. A fluidez do esperma é notavel, podendo ser os testiculos esvasiados totalmente. Para o lado da atividade funcional dos espermatozoides, nota-se o despertar da vitalidade nos que habitualmente se mostram inativos antes da desova natural, e nos que já apresentam motilidade antes da desova, a movimentação alcança o maximo sob a ação dos hormonios hipofisarios.

TABELA 4

Astyanax bimaculatus	Femea n.º 9112 (não injetada)	Femea n.º 9113 (injetada) (*)
Comprimento em mm.	70	73
Altura em mm.	24	30
Peso do peixe em gr.	9,650	12,330
Peso dos ovarios em gr. . . .	1,945	4,050
Cubagem dos ovarios em cc. .	1,500	4,750
Numero de ovulos por gr. . .	8.245	4.150
Numero total dos ovulos . . .	16.037	16.810
Aspéto geral dos ovarios . . .	Pouco aumentados; colorido geral uniformemente claro com os interstictos de limitação dos ovulos esverdeados; ovulos pequenos e amarelados.	Muito aumentados; colorido geral esverdeado com pequenos pontos esbranquiçados. Ovulos maiores, esverdeados, de aspéto gelatinoso a ponto de poderem ser vistos, por transparencia, os ovulos pequenos amarelados (imaturos), que servirão para nova desova.

(*) Dose: ½ hipofise fresca

TABELA 5

Macho não injetado (*)

Testiculos	Estado dos testiculos	Caracteristicos do esperma	Movimentação dos espermatozoides das porções caudal e cefalica
Direito	Aumentados de volume, emitindo esperma por pressão	Pouco fluido, não se misturando bem com a agua	Nula
Esquerdo	Idem	Idem	Idem

Macho injetado com ½ hipofise e examinado depois de 24 horas

Direito	Aumentados de volume, emitindo esperma após ligeira pressão	Muito fluido, misturando-se perfeitamente bem com agua	0 — 45" — 70"
Esquerdo	Idem	Idem	0 — 50" — 70"

(*) *Astyanax taeniatus* do açude Prata, Paraíba, em 10-1-935

Com a aplicação dos triturados de hipofise fresca de peixe em casais semipreparados para a desova natural, já obtivemos a desova artificial de 10 especies, pertencentes a 9 generos, que, por sua vez, fazem parte de 5 subfamilias de Characideos e 3 de Nematognathas, a saber:

Esquema parcial dos TELEOSTEI-OSTARIOPHYSI

- CHARACIDAE
  - CURIMATINAE - *Curimatus elegans*
  - PROCHILODINAE - *Prochilodus argenteus*
  - ANOSTOMATINAE - *Schizodon vittatus*
  - ERYTHRININAE - *Hoplias malabaricus*
  - TETRAGONOPTERINAE
    - *Astyanax bimaculatus*
    - *Astyanax taeniatus*
- NEMATOGNATHI
  - TRACHYCORISTIDAE - *Trachycoristes striatulus*
  - LORICARIIDAE - *Plecostomus plecostomus*
  - PIMELODIDAE
    - *Pimelodella lateristriga*
    - *Rhamdia quelen*

Após a desova forçada, pela subsequente fecundação natural ou artificial dos produtos sexuais, obteve a C. T. P., até hoje, mais de 500.000 alevinos dessas especies, uma parte dos quais foi distribuida para os açudes e outra se prestou aos mais variados estudos biologicos. Relataremos, a seguir, as hipofisações executadas por um de nós numa das especies citadas, o aracú do Amazonas *(Schizodon vittatus)*.

Total dos exemplares hipofisados: 144 ♂♂ e 134 ♀♀. Dóse ótima injetada: $2\frac{1}{2}$ hipofises. As desovas foram obtidas 4 a 6 horas após a injeção.

RESULTADOS GERAIS OBSERVADOS NAS FEMEAS INJETADAS

10 ♀♀ — Fluidez ovular ausente. Ovarios retraidos.
9 » » — » » » » túrgidos com ovulos maduros.
11 ♀♀ — Fluidez ovular presente. Ovarios túrgidos com ovulos maduros.
104 ♀♀ — Desovadas. Os ovulos foram fecundados natural ou artificialmente.

134 ♀♀

RESULTADOS GERAIS OBSERVADOS NOS MACHOS INJETADOS

113 ♂♂ — Esperma francamente ligado e fluido facilmente.
31 » » — Testiculos totalmente esvasiados.

144 » »

RESULTADOS GERAIS OBSERVADOS NOS TESTEMUNHAS

168 ♀♀ — Fluidez ovular ausente. Nenhuma modificação ovariana e ovular.

5 ♂♂ — Fluidez espermatica ausente.
169 » » — » » grossa e viscosa.
342 ♀♀ e ♂♂

Do que aí foi exposto sumariamente, deduz-se que as desovas forçadas, obtidas com o emprego dos hormonios hipofisarios, são equivalentes ás desovas naturais. Naquelas tudo se passa tal qual acontece nestas. Assim, os peixes que em natureza desovam parceladamente, Tetragonopterineos, Erythrinineos, etc., tambem o fazem quando sujeitos á ação dos hormonios hipofisarios; os de desova natural total, *Prochilodinae, Anostomatinae, Pimelodinae, Trachycoristinae, Curimatinae,* etc., artificialmente tambem desovam totalmente.

Hipofise sêca de peixe sobre peixe ovado: — Quinhentas hipofises sêcas, pesando cada uma em média 5 mgs., foram-nos enviadas de S. Paulo pelo Dr. D. Cardoso. Com esse material fizemos uma série de experiencias utilizando-nos dos Tetragonopterineos e, ante os resultados obtidos, chegamos á conclusão de que hipofises fresca e sêca são praticamente equivalentes (8). Infelizmente não podemos afirmar, com segurança, quanto tempo pode perdurar a eficiencia dos hormonios nas hipofises sêcas. Para se preparar uma suspensão de hipofises sêcas mais ou menos homogenea, deve-se ter o cuidado de humidecer bem o pó antes de mistura-lo com o veiculo.

Rugh, durante seus trabalhos de hipofisação de rãs, verificou que a hipofise desses animais é soluvel em agua e soluções alcalinas. Afirma esse autor que, em solução aquosa, ela pode ser guardada em refrigeradores pelo espaço de alguns dias. Se a hipofise fôr colocada em alcool a 70 %, sua ação permanecerá praticamente inalterada durante algumas semanas, e se em vez de alcool a 70 %, usarmos a 100 %, no qual nenhum dos seus hormonios se dissolve, a atividade da glandula perdurará indefinidamente, pois os ultimos tests comprovaram a perfeita atividade de glandula que permaneceu em alcool absoluto pelo espaço de um ano. Antes de se utilizar o material conservado em alcool a 100 %, deve-se submete-lo a alcool mais diluido, até 30 %.

Hipofise de mamiferos sobre peixes: — A tése da inespecificidade zoologica dos hormonios é uma das mais discutidas nos dias atuais, pois apenas está estabelecida para os hormonios da tireoide, pancreas e ovarios. Para o hormonio folicular, conhecido pelos nomes de foliculina, teelina, estrina, etc., as experimentações foram mais longe e mostraram que esse hormonio, mesmo quando extraido de peixes, insétos e até de vegetais, atúa plenamente sobre mamiferos;

ainda mais, Aschheim e Hohlweg encontraram a estrina em diferentes produtos betuminosos; assim, pode-se obter, do carvão de pedra e do petroleo bruto, um extrato capaz de provocar o estro em animais castrados e de corrigir a atrofia do utero e das trompas (10).

Thales Martins, no seu notavel tratado sobre as glandulas sexuais e hipofise, refere um grande numero de autores cujas experiencias robustecem a teoria da inespecificidade zoologica dos hormonios. Com enxertos de peixe *Lepidosteus,* Wills, Riley e Stubbs observaram ovulação em um unico exemplar de *Rana pipiens;* Koch, afirma haver verificado que o hormonio da hipofise excita e remove dificuldades no ciclo da reprodução, tanto em mamiferos como em aves, sem especificidade. Mais recentemente, Schapiro (15), afirma que obteve a cópula e a desova em 71 casais de sapos *(Xenopus laevis)* com injeções de extratos de urina gravidica (Katzman e Doisy, 1932); os mesmos resultados foram obtidos em 20 outros casais com o emprego do extrato do lóbo anterior, mas o autor observou que os resultados, no primeiro caso, são verificaveis mesmo na quadra do ano que medeia duas épocas de reprodução natural (Julho a Setembro, Africa do Sul), ao passo que, no segundo caso, eles vão peorando á medida que se afastam dessas épocas. Rostand (12) demonstrou que a hipofise de *Rana temporaria* atúa sobre *R. esculenta* e vice-versa; ao contrario, o extrato da glandula de peixes, reptis, aves e mamiferos não tem ação sobre *Rana.* Rugh (13), trabalhando com anuros *(Rana clamitans, R. catesbiana, R. pipiens, R. palustris* e *Bufo fowleri),* depois de submete-los á ação de hipofises da mesma especie e de mamiferos, observou o reflexo do abraço em *R. clamitans, R. catesbiana* e *B. fowleri;* lembra a possibilidade de se obterem ovos e girinos em qualquer época do ano, desde que se empregue o extrato de hipofise em animais cuja maturação ovular e desova foram retardadas pelo frio; afirma o mesmo autor que, não só extrato do lóbo anterior da hipofise de mamiferos, mas tambem a glandula integral de ovelha e a Antuitrina S. de urina gravidica atúam sobre *Bufo.*

Thales Martins comparava exuberantemente a ação da hipofise entre os mamiferos «mesmo quando os doadores e receptores são de sexo diverso e não pertencem á mesma especie» (10). Mas, ao referir-se aos efeitos dos hormonios hipofisarios, quando a hipofise provém de especie muito afastada da a que pertence o animal de experiencia, afirma que «os resultados são variaveis», citando varias conclusões a que chegaram diversos experimentadores, demonstrando, por exemplo, que a hipofise do pombo foi negativa em camondongos, ou pelo menos atuou menos intensamente; as de mamiferos, aves, peixes e rãs foram negativas em sapos e as destes dois ultimos tambem o foram

em mamiferos. CREASER e GORBMAN (4), utilizando a *Rana pipiens* como test, fizeram interessantes experiencias que resumiremos nas conclusões seguintes: a) para a ovulação da *R. pipiens,* foram negativos os enxertos da glandula hipofisaria dos peixes *Stizostedion vitreum, Perca flavescens* e *Cristovomer namaycushi;* b) negativas tambem foram as injeções de extratos do lóbo anterior da hipofise de bovinos, da glandula total de ovinos, do sôro de eguas prenhes e da urina de mulher gravida; c) foram positivas as implantações homoplasticas e os enxertos da glandula de *Rana sphenocephala,* considerada por muitos autores como sinonima de *Rana pipiens;* d) eliminando, um a um, os fatores externos que porventura fossem capazes de perturbar os resultados finais das experiencias (dóse, temperatura, presença de machos, possivel destruição dos hormonios ocasionada pela hidrolise ou pela putrefação, substancias preservativas ou dissolventes dos extratos, responsaveis, em alguns casos, pela diminuição da capacidade funcional de certos orgãos), concordam aqueles autores em aceitar «uma variação interespecifica nos hormonios gonadotropicos, a despeito da noção correntemente aceita da absoluta uniformidade dos hormonios». D. CARDOSO, em Jatobá, Pernambuco, injetou em peixes juvenis *(Pimelodus clarias* e *Franciscodoras marmoratus)* até 550 U. R. de hormonios da hipofise de mamiferos em 11 injeções diarias de 50 unidades cada uma. Ao inverso, dois ratos infantis foram injetados com 100 hipofises frescas de peixes e mais uma femea com 52, em injeções diarias de 6 a 7 hipófises. Os resultados foram negativos em ambas as experiencias. KOCH e SCHEURING, (9), injetando hormonios da urina (Prolan da I. G.) em trutas de 3 a 4 anos, isto é, de 1.ª a 2.ª desova, só obtiveram resultados negativos. Não satisfeitos com os resultados negativos dessas experiencias, repetiram-nas, empregando dessa vez, além do Prolan, um ativador proveniente do lóbo anterior da hipófise, pois é sabido que os hormonios encontrados na urina (Prolan) não agem com a mesma eficiencia com que os do lóbo anterior e daí a ideia dos americanos, nos seus trabalhos com aves e mamiferos, de empregarem um ativador daqueles hormonios. Assim, 3 femeas de truta, de 210 a 280 grs. de peso, receberam 6 injeções de 500 U. R. de Prolan, ou seja um total de 3.000 U. R. Autopsiadas, nenhuma modificação apresentaram as suas gonadas. Duas outras femeas, que tambem receberam 3.000 U. R., ficaram em descanso durante 64 dias e depois foram injetadas 4 vezes com 250 U. R. de Prolan e 11 U. de ativador, perfazendo um total de mais de 1.000 U. R. de Prolan e 44 U. de ativador. Tambem desta vez os resultados foram negativos.

Nós, trabalhando com peixes ovados, egualmente empregamos não só os hormonios hipofisarios de mamiferos, como ainda preparados

de outras glandulas (ovario, corpo amarelo, hipofise anterior e posterior) sob a forma de hidrolisados, segundo o metodo do Prof. J. N. Kassakov de Moscou. Não fomos mais felizes do que Koch e Scheuring.

TABELA 6

Produtos farmaceuticos

Especie	Sexo	Dose	Resultado
Prolan «Bayer»			
P. argenteus . . .	2 ♀ 2 ♂	50 — 100 U. R.	Negativo
Preloban «Bayer»			
P. argenteus . . .	10 ♀ 10 ♂	1 — 3 — 5 — 10 — 20 U. M.	Negativo
Hidrolisado (Hipofise anterior)			
P. argenteus . . .	30 ♀ 31 ♂	0,02 — 0,05 — 0,1 — 0,2 — 0,6 — 0,8	Negativo
C. elegans	4 ♀ 4 ♂	0,01 — 0,02 — — — —	»
A. bimaculatus . .	12 ♀ 12 ♂	0,025 - 0,01 — 0,02 — —	»
P. plecostomus . .	6 ♀ 3 ♂	0,1 — 0,2 — 0,6 — —	»
Hidrolisado (Hip. anterior + posterior)			
A. bimaculatus . .	7 ♀ 7 ♂	0,001 — 0,01 — 0,1	Negativo
Hidrolisado (Hip. anterior + posterior + corpo amarelo + ovario)			
A. bimaculatus . .	9 ♀ 8 ♂	0,02 — 0,1 — 0,2	Negativo

Não satisfeitos com esses resultados, fomos além e, servindo-nos ainda de peixes ovados, lançamos mão das hipofises frescas de bovinos e ovinos, mas tambem desta vez nenhum resultado positivo obtivemos. Resumiremos as nossas experiencias na tabela seguinte.

Devemos assinalar, todavia, que durante essas experiencias, constatamos alguns resultados (tabela 8) que, sem ser de todo positivos, não deixam de chamar a atenção do experimentador para uma possivel ação de tais hormonios sobre as gonadas dos peixes. Ainda mais, quando um de nós e M. Vianna Dias, 1936, estudavamos a biologia do saguirú *(Curimatus elegans)*, submetemo-lo a injeções de triturados de hipofises frescas de bovinos, ovinos e aves.

TABELA 7

Hipofise fresca

Bovideos (lóbo anterior)

Especie	Sexo	Dose	Resultado
P. argenteus	18 ♀ 16 ♂	1/10 — 2/10 — 4/10 — 6/10 — 1 — 2 — 3	Negativo +
T. striatulos	9 ♀ 2 ♂	1/10 — 2/10 — 6/10	»

+ Uma ♀ apresentava pontos de maturação num dos ovarios.

Bovideos (total)

T. striatulos	18 ♀ 6 ♂	1/10 — 3/10 — 6/10 — 3/4	Negativo X
P. argenteus	5 ♀ 4 ♂	1/10 — 1 — 1	» +

+ Duas ♀ apresentavam pontos de maturação nos ovarios
X » ♀ » fluidez ovular

Cumpre-nos assinalar previamente que esta especie não é bom test para os trabalhos com hipofise, pois é extremamente sensivel, podendo, em cativeiro, desovar apenas com a passagem de uma corrente de agua pelo aquario e, algumas vezes, até com a simples mudança de agua nele (8).

Feita esta previa justificativa, resta-nos afirmar que observamos a desova em saguirús, submetidos á ação de hipofise fresca de peixe, depois de 4 a 6 horas; sob a ação da hipofise fresca de aves desovaram dentro de 11 a 12 horas; pouco mais demorada foi a ação da hipofise de mamiferos (bovinos e ovinos): 16 a 20 horas e quando sob a ação de agua corrente, somente, a desova se fazia dentro de 28 a 40 horas.

A observação cuidadosa dos resultados de todas as experiencias citadas linhas atraz, leva-nos a participar do modo de pensar de THALES MARTINS que procura explicar os resultados negativos obtidos em muitas delas, não pela especificidade zoologica dos hormonios e sim por razões mais simples, «como a menor riqueza em hormonios, a absorção perturbada, ou a variação quantitativa (e essa existe de fato), dos diferentes componentes do complexo hormonal que é o lóbo anterior, com a influencia que reciprocamente exercem».

METODO DA HIPOFISAÇÃO

Vias de acesso: — Por duas vias costumamos atingir a hipofise dos peixes: a) através da boca, rompe-se a base do esfenoide até ser encontrada a loja da hipofise; b) retira-se a parede ossea superior que protege o cerebro, levanta-se o encefalo e descobre-se, em seguida, a loja hipofisaria. Só nos servimos da primeira via quando desejamos conservar para estudos o exemplar que nos vae fornecer a hipofise, pois esta via de acesso, mutilando menos o exemplar, exige maior cuidado e dispendio de tempo.

Os processos de PARKER e MATTHEWS para a hipofisectomia nos peixes, foram modernamente modificados por ABRAMOWITZ (1) que, controlando a operação com a ajuda de um microscopio binocular, executa-a em menos de cinco minutos, podendo o peixe sobreviver pelo praso de alguns meses.

Tecnica para extração: — A diversidade da conformação craneana das diferentes especies de peixes condiciona a localização mais ou menos variavel da loja hipofisaria. Assim sendo, não se podem tomar constantemente os mesmos pontos de reparo para se proceder á craniotomia; todavia, deve-se procurar sempre o bordo posterior do ocipital, que é o melhor ponto de reparo. Localizado o ocipital, ao longo do seu bordo posterior, um pouco para a frente ou para traz, conforme a especie, pratica-se no craneo um corte perpendicular e transversal que, depois de seccionar a massa encefalica, deve cair a menos de meio centimetro para traz da loja hipofisaria. Rebate-se para frente a parede superior da caixa craneana, para o que se cortam os seus esteios laterais e assim fica exposta a massa encefalica. Levantada esta, pode-se ver a ligação da glandula com a base do cerebro. Secciona-se esse pediculo de ligação e, com uma pinça de ramos curvos e finos, rompe-se a membrana que reveste a glandula, retirando-a, finalmente, de sua loja.

Tecnica da injeção: — Depois de extraídas, as hipofises são trituradas em um gral, a sêco e, com solução salina a 6 $^0/_{00}$, prepara-se a suspensão a ser injetada. Nos peixes de escamas, de grande porte, o ponto de eleição para a injeção é o pedunculo caudal, mais ou menos ao nivel da adiposa, devendo-se evitar a linha lateral. Nesse ponto as escamas estão mais coladas ao corpo do peixe, de modo que o refluxo da suspensão é quasi nulo, principalmente si se fizer, depois de retirada a agulha, uma ligeira pressão no local onde a péle foi perfurada. Nos peixes de couro, pode-se aplicar a injeção em qualquer parte da musculatura dorsal, desde que se comprima depois o ponto de perfuração da péle. Nos peixes de pequeno porte, como os Tetra-

gonopterineos, o local indicado é a musculatura do dorso, mais ou menos ao nivel da nadadeira dorsal, utilizando-se o veículo na quantidade minima possivel.

Dóse a ser injetada: — Em trabalhos anteriores já discutimos de certo modo esta questão; no momento, vamos apenas expôr resumidamente o nosso ponto de vista, acerca do assunto.

Não se pode afirmar, de um modo geral, qual a dóse de hipofise indicada para a obtenção da desova forçada nas diversas especies de peixes, pois ela depende mais do estado evolutivo das gonadas do que propriamente do tamanho do peixe. Ainda em relação á dóse de hipofise, convem referir que estamos procurando determinar a unidade funcional dos hormonios hipofisarios para peixes, o que ainda não havia sido feito, devido á exiguidade de tempo e á falta de condições adequadas a tais trabalhos. No presente estudo, portanto, nos limitaremos a dizer que adotamos como unidade provisoria o triturado total de uma hipofise, cujo peso aproximado é de 1 a 2 mgs., quando proveniente de peixe adulto medindo de 250 a 350 mm. e pesando 400 a 800 grs.

As nossas experiencias, nestes ultimos quatro anos, permitem-nos afirmar que a dóse de $^1/_2$ unidade, para peixes adultos de 100 mm. e a de $2\,^1/_2$ para os de 250 a 400 mm., são suficientes para desencadear neles a desova, desde que os reprodutores estejam mais ou menos preparados para a desova natural, isto é, 4 a 5 semanas antes desta.

Quando os reprodutores apresentam as suas gonadas num estado evolutivo de relativo atrazo, uma só injeção, como no caso anterior, não será suficiente para provocar a desova nem mesmo aplicando dóse muito elevada, o que, além disso, não é indicado, por razões que adiante mostraremos. Nestes casos, em peixes de 250 a 400 mm., aconselhamos dóses pequenas e repetidas: $^1/_4$ a $^1/_2$ unidade durante dias seguidos ou alternados; se ao fim de determinado prazo (10 a 12 dias) não se obtiver a desova, deve-se aplicar então uma dóse final de $2\,^1/_2$ unidades.

Dissemos que as dóses massiças (50 a 100 U.) são contra-indicadas, e isso por duas razões: a) se o peixe está com suas gonadas bem evoluidas, é desnecessaria tão grande dóse, que poderá acarretar até a morte do reprodutor, acidentes varios (choque, hemorragias dos vasos do aparelho genital, abcessos no local da injeção, etc.); b) se as suas gonadas não se encontram preparadas para a desova, as dóses massiças poderão forçar o peixe a uma desova em que os produtos geneticos se apresentam com diminuta vitalidade. Será facil deduzir as consequencias de semelhante desova: ou não haverá fecundação, o

que é mais comum, ou se processa a fecundação do ovulo, mas a evolução do ovo só prossegue até determinadas fases (segmentação e no maximo até blástula). As dóses pequenas são bem toleradas pelos peixes, desde que nenhum orgão interno seja lesado durante a injeção.

Rugh, trabalhando com rãs, confirma as nossas observações em peixes, quando diz que a dóse de hipofise necessaria para provocar a ovulação na rã decresce á medida que se aproxima a época da sua desova natural. A glandula do doador, neste periodo, segundo Rugh, tem a sua atividade aumentada; a glandula do receptor pode começar a elaboração do hormonio desde o fim da hibernação, e os ovarios, é ainda Rugh quem o afirma, reagem diferentemente, ao mesmo estimulo, conforme a época do ano.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Nunca será demais repetirmos que a hipofisação veio abrir novos horizontes á piscicultura nacional, permitindo o aproveitamento racional das mais exigentes especies da nossa ictiofauna. Por varias vezes tivemos ocasião de assinalar que a maioria dos peixes da zona neotropica tem a sua desova na dependencia diréta de fatores exogenos, principalmente de ordem meteorologica. Da incidencia irregular desses fatores, resulta a aritmia da desova dos peixes nacionais, pois eles não podem fugir á ação desses fatores.

Não sómente entre nós, mas tambem no estrangeiro, poderá a hipofisação prestar relevantes serviços á piscicultura. Assim, as muito interessantes experimentações de Foerster, relativas a cruzamento de raças de Salmonideos (5), poderiam haver proporcionado muito maior soma de casos positivos, se o autor houvesse aplicado o processo da hipofisação nos exemplares de que não pôde obter o fluxo dos ovulos.

Juday, da Universidade de Wisconsin, U. S., desejoso de empregar esse processo para forçar a desova de algumas especies americanas, acaba de pedir, á Comissão de Piscicultura, informações detalhadas a respeito da tecnica por ela adotada.

CONCLUSÕES

Da exposição que acabamos de fazer, podemos tirar varias conclusões: a) para os nossos trabalhos praticos de piscicultura, só nos convem, no momento, o emprego da hipofise de peixes, pois ela satisfaz plenamente os objetivos do nosso serviço; b) o emprego da hipofise de outros animais sobre peixes, para fins de desova, não deu resultado pratico; c) a hipófise sêca e a conservada em alcool (desta não temos ainda observação propria) facilitam os trabalhos de hipofisação; d) a possibilidade de se forçar a desova dos peixes nacionais

em mais de uma quadra do ano, seria teoricamente possivel, devendo-se respeitar, porém, o tempo minimo necessario ao diestro ou fase de repouso desses animais; e) a época mais indicada para se forçar a desova nos peixes é a que precede de algumas semanas 4 a 6, a da desova natural; f) a quantidade minima de hipofise capaz de provocar a desova deve ser determinada para a especie com que se vae trabalhar.

Lembraremos, ao terminar, que uma série de questões interessantissimas ainda estão sendo estudadas; mas para a criação artificial dos peixes já nos encontramos perfeitamente aparelhados.

Ao Dr. R. von Ihering, Chefe da Comissão a que pertencemos, deixamos aqui expressos os nossos agradecimentos pelo grande interesse com que sempre nos acompanhou, orientando-nos durante as nossas experiencias.

Ao Dr. J. R. Meyer, subdiretor da Divisão Animal do Instituto Biologico de S. Paulo, a quem devemos todo o estudo histologico da hipofise, somos extremamente gratos, e os mesmos agradecimentos apresentamos ao nosso prezado amigo Dr. J. J. Maciel, de S. Paulo, que nos forneceu o material hidrolisado de que necessitamos para uma série de experiencias.

Cumpre-nos tambem agradecer aos nossos colegas da Comissão o auxilio que sempre nos prestaram.

THE PITUITARY AND ITS ACTION ON THE GONADS OF THE NEOTROPIC FISHES

Abstract

This paper reports the results of an anatomical and histological study of the pituitary gland of teleosts. It considers also methods of approach and removal of the gland, preparation and dosage of extracts for experimental purposes, development of the gonads, maturation of the eggs, and finally, action of its gonadotropic hormones.

Various experiments were made with the young of Francisco-doras marmoratus and Pimelodus clarias by Dr. Dorival Cardoso *and one of the authors (Bibl. 3). One group of F. marmoratus received, during 10 days, daily injections of eight units of extract of pituitary glands taken from adult fish. At the end of the 10 days, the weight of the gonads of the females had increased 370 percent over those of the controls. A group of P. clarias received daily injections of eight units for 13 days, when the gonads of the males had increased 310 percent over those of the controls.*

The power of pituitary extract to induce spawning in mature fish, from one to two months prior to the normal time of spawning, was clearly demonstrated for the following species: Prochilodus argenteus, Schizodon vittatus, Hoplias malabaricus, Curimatus elegans, Astyanax bimaculatus, Astyanax taeniatus, Pimelodella lateristriga, Rhamdia quelen, Trachycoristes striatulus and Plecostomus plecostomus.

Various experiments were made on fishes, using several kinds of extracts of pituitary from cattle, sheep, and birds, but no success was had in inducing spawning. After discussing briefly the question of specificity of the hormones, the writers accept the point of view of Thales Martins *(Bibl. 6), who explains the negative results of many experiments otherwise than by zoological specificity of hormones. He suggests (pg. 207) that negative results may be a consequence of lower concentration of hormone, abnormal absorption, or quantitative variation in the different components of the hormonal complex of the anterior lobe, with resultant change in their reciprocal influences.*

BIBLIOGRAFIA

1 — Abramowitz, A. A. — 1937 — The opercular approach to the pituitary, *Science,* Lancaster, Pa., 85, (2.217): 609.

2 — Azevedo, P. de, M. V. Dias & B. B. Vieira — 1938 — O saguirú ou piabussú do Ceará (Characidae, Curimatinae), no prelo.

3 — Cardoso, D. M. — 1934 — Relação genito-hypophysaria e reproducção nos peixes. *Arch. Inst. Biologico,* S. Paulo, 5, 133-136.

4 — Creaser, W. C. & A. Gorbman — 1936 — Specificity of the pituitary gonadrotopic factor as demonstrated in Amphibia. *Copeia,* (Ann Arbor, Michigan) 2, 91-94.

5 — Foerster, R. E. — 1935 — Inter-specific Cross-breeding of Pacific Salmon. *Transactions of the Royal Society of Canadá,* 29, 21-23.

6 — Ihering, R. von & P. de Azevedo — 1934 — A curimatã dos Açudes Nordestinos (Prochilodus argenteus). *Arch. Inst. Biologico,* S. Paulo 5, 143-184.

7 — Ihering, R. von & P. de Azevedo — 1936 — A desova e hypophysação dos peixes. Evolução de dois Nematognathas. *Arch. Inst. Biologico,* S. Paulo, 5, 107-118.

8 — Ihering, R. von & P. de Azevedo — 1936 — As piabas dos Açudes Nordestinos (Characidae, Tetragonopterinae). *Arch. Inst. Biologico,* São Paulo, 7, 75-106.

9 — Koch, W. & L. Scheuring — 1936 — Die Wirkung von Hypophysenvorderlappenhormon auf den Laichakt von Fischen. *Zoologischer Anzeiger,* 116, 62-64.

10 — Martins, T. — 1936 — Glandulas sexuaes e hypophyse anterior. *Tratado de endocrinologia.* Companhia editora nacional. S. Paulo.

11 — Penau H., H. Simonnet & L. Blanchard — 1929 — *L'hypophyse.* Paris.

12 — Rostand, J. — 1936 — Hypophyse et ovulation chez les batraciens. *C. R. Soc. Biol.*, **117**, 1079-1081.

13 — Rugh, R. — 1935 — Pituitary-induced sexual reactions in the annura. *Biol. Bull.*, **68**, 74-81.

14 — Rugh, R. — 1937 — Ovulation-induced out of season. *Science*, Lancaster, Pa., **85**, (2.216): 588-589.

15 — Schapiro, H. A. — 1936 — Experimental induction of coupling in Xenupus laevis, with the production of fertilised eggs. *Journal of exp. Zool.*, **71**, 149-162.

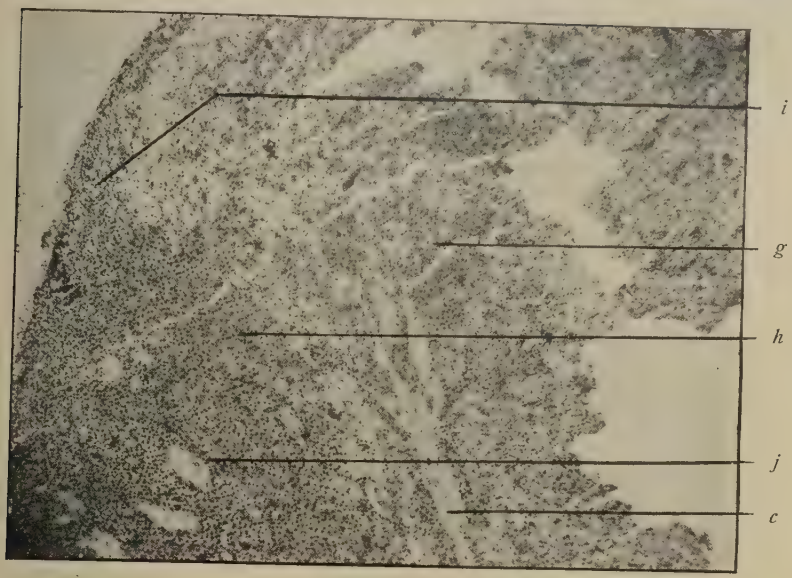
EXPLICAÇÃO DA ESTAMPA 16

Fig. *A* — Microfotografia da peça I, mostrando as duas porções histologicamente diferenciaveis.

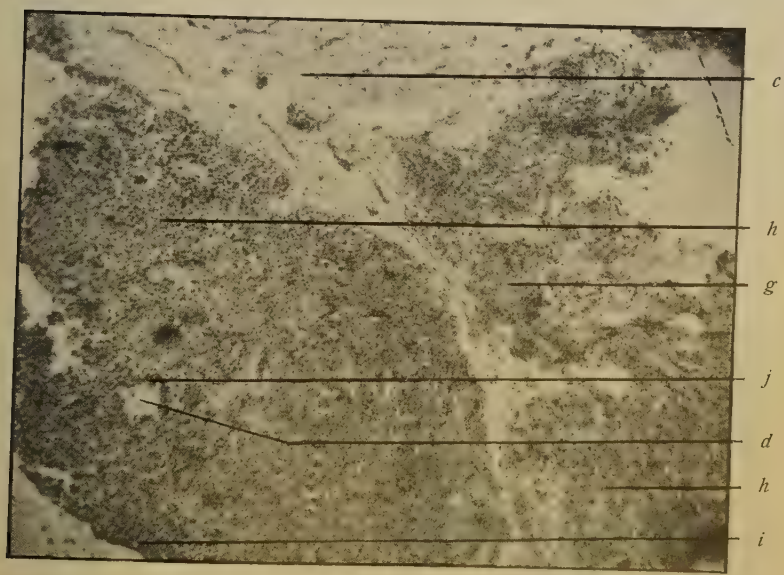
Fig. *B* — Microfotografia da peça II, mostrando as duas porções histologicamente distintas.

i) celulas pequenas semelhantes a linfocitos;
g) celulas grandes, claras, vacuolisadas e cromofobas;
h) celulas acidofilas compactamente dispostas;
j) celulas basofilas aplicadas sobre filetes fibrilares;
c) septos espessos de tecido fibrilar nervoso;
d) filetes de tecido fibrilar cercados por uma camada da celulas basofilas.

———o———



A



B

Vol. 9 — Art. 18 Novembro de 1938

INIMIGOS NATURAIS DA "PLATYEDRA GOSSYPIELLA (SAUNDERS)" NO ESTADO DE SÃO PAULO

VESPAS DEPREDADORAS E ESPECIES DE PARASITAS COM NOTAS SOBRE A SUA BIOLOGIA

POR

H. F. G. Sauer

Do Instituto Biologico de S. Paulo

Com as estampas 17-18

INTRODUÇÃO

A lagarta rosada, uma das pragas que mais afetam a cultura algodoeira no Estado de São Paulo e cuja área de disseminação se extende por todas as suas zonas com um gráo de intensidade mais ou menos uniforme, conta uma série de inimigos naturais que aparecem distribuidos por todo o ano, os quais indubitavelmente concorrem para o estabelecimento de certo equilibrio, limitando, embora parcialmente, os efeitos prejudiciais desse inseto. Não sendo geralmente aplicadas com o rigor necessario as medidas de profilaxia e combate, essa praga constantemente encontra condições em que praticamente só os fatores naturais influem no seu desenvolvimento e controle.

Durante as investigações que vêm sendo realizadas e referentes ao comportamento da *Platyedra gossypiella* (SAUND.) nas condições da lavoura paulista, muita atenção tem sido dispensada ao reconhecimento e estudo dos seus inimigos naturais, com o fim de determinar a importancia de cada um, a distribuição e ocorrencia nas diversas épocas do ano e a biologia das especies conseguidas.

As notas constantes do presente trabalho são o resumo das primeiras observações realizadas nesse sentido.

Em capitulo distinto mencionamos outras especies de microhimenopteros parasitas colhidos nas gaiolas de criação, onde centenas de capulhos atacados foram colocados, mas cujos verdadeiros hospedeiros não nos foi possivel determinar.

Além das inspeções que são realizadas nas proprias lavouras, conseguimos, por intermedio da Inspetoria Geral do Serviço de Combate á Bróca do Café, que nos fossem remetidas, em varias épocas, maçãs e capulhos de algodão provenientes dos diversos municipios representativos das diferentes zonas algodoeiras do Estado, os quais, postos em gaiolas, não só forneceram os dados sobre a existencia das especies,

como tambem revelaram a sua intensidade e distribuição durante as diversas estações do ano.

Segundo nos foi dado constatar até o presente, ocorrem no Estado de S. Paulo pelo menos quatro especies de vespas depredadoras, duas das quais muito importantes, bem como nove especies de parasitas primarios da lagarta rosada, que enumeraremos a seguir:

VESPAS DEPREDADORAS

Durante a cultura 1936-1937 a infestação média das partes florais dos algodoais do Estado foi de 42 %. Quando aparecem os primeiros botões florais, e seguidamente até quando um determinado numero de maçãs já se formaram, as traças da *Platyedra gossypiella* (Saund.) efetuam a oviposição nessas partes, o que provoca a infestação de botões em diversos gráos de desenvolvimento. Uma parte deles, por ser grandemente prejudicada, cae. Outros, porém, apesar de atacados, conseguem transformar-se em flôres. Muitas destas, devido aos danos que sofreram, não são fecundadas, o que redunda numa diminuição ou retardamento da colheita.

As flôres atacadas são tipicas e facilmente reconhecidas num algodoal. Não se abrem totalmente como as demais. As lagartas, principalmente si a postura se realizou em botões de maior tamanho, não conseguem completar o ciclo antes do desabrochamento do botão. Como não possuem outra proteção que não sejam as proprias pétalas, evitam que estas se abram. Por meio de um tenue tecido fixam as extremidades superiores e internas das pétalas de tal forma que a flôr se abre parcialmente, ficando com os orgãos centrais, onde a lagarta se acha, protegidos pelas proprias pétalas.

Chamou-nos a atenção o fáto dessas flôres estarem sem as lagartas que normalmente deveriam conter. Verificamos posteriormente que durante a manhã a sua presença nas flôres era sempre muito maior do que á tarde. E a frequencia com que eram encontradas diversas especies de vespas nos algodoais desviou para elas a nossa atenção. Foi determinado em Dezembro e Janeiro, épocas em que a existencia das lagartas nas flôres é mais pronunciada, que tais vespas concorreram para a destruição de 87,6 % de lagartas existentes nesse tipo de flôr atacada.

Tais depredadores forçam uma abertura entre duas pétalas e destróem ou carregam a lagarta, deixando na flôr visiveis sinais da sua passagem.

A maior atividade se observa durante o periodo entre 9 e 14 horas e é constante durante todo o tempo em que existem flôres infes-

tadas, as quais são comuns, si bem que em proporções cada vez mais reduzidas á medida que se vae aproximando o fim da colheita.

O seu ataque limita-se principalmente ás lagartas das flôres que desabrocham num mesmo dia. As que não são atacadas nessa ocasião dificilmente o serão quando as flôres já estão murchas. Em dias chuvosos ou de ventos fortes não são tão abundantemente assinaladas.

Até presentemente foram constatadas 10 especies de vespas que frequentam os algodoais. De seis delas, apesar dos habitos no campo serem semelhantes ao das demais especies, ainda não possuimos informações suficientes para documentar em definitivo as observações preliminares. São mais raras e mais dificeis de serem vistas.

Por intermedio do Snr. R. L. Araujo, da Secção de Entomologia do Instituto Biologico, obtivemos a determinação das 4 especies mais comuns e cuja eficiencia deve ser salientada, notadamente para as duas ultimas, que se equiparam em quantidade e importancia. São, pela ordem crescente de importancia: *Mischocyttarus cassununga* R. e I., *Polybia sericea* (Ol.), *Polybia occidentalis scutellaris* (White) e *Polybia atra* Sauss, todas fartamente distribuidas por todas as regiões de São Paulo.

As lagartas que completam o ciclo nas partes florais são as principais responsaveis pela infestação das maçãs formadas no começo da cultura. E as vespas, concorrendo para a redução de um fóco primordial, retardam consideravelmente o ataque das maçãs, beneficiando desse modo a colheita.

Os elementos de que dispomos relativamente a esses inimigos tornam-os um dos mais importantes agentes de destruição da nossa principal praga.

PARASITAS PRIMARIOS

Perisierola nigrifemur (Ashm.) *(Hym. Betylidae)*

A constatação desta especie foi feita em 10 de Junho de 1937 em frutos de *Hibiscus bifurcatus* atacados pela lagarta rosada. Posteriormente, em 15 de Agosto, foi encontrada sobre lagartas de um piralideo, ainda indeterminado, alimentando-se de sementes de *Walteria americana* e folhas de *Sida cordifolia,* ambas da familia *Malvaceae.* Desde Junho de 1937 foi colhida em gaiolas contendo capulhos de algodão em maiores proporções. Em 1938, desde Março, conseguiam-se formas adultas nessas gaiolas. Conquanto seja essa especie muito comum e assás distribuida no Estado, notadamente de Março a Outubro, as suas proporções não são de molde a nos convencer da sua importancia como parasita. Seu ataque é principalmente restrito aos capulhos abertos, apesar de se terem verificado no campo maçãs, com uma perfuração

pelo menos, feita pela lagarta, nas quais se encontraram adultos no interior das fibras. Acreditamos que o parasita assim proceda para atacar as lagartas que ainda se encontrem dentro das maçãs. Observamos ainda, em menores proporções, o seu parasitismo sobre as lagartas que infestam as flôres.

A criação em laboratorio se fez com facilidade á temperatura média de 22° C. Colocando-se femeas virgens e machos num tubo de vidro, com ambas as extremidades tapadas com algodão, presenciou-se a copula repetidas vezes. Esse áto é feito com rapidez. Mais de uma vez notámos o macho saltar sobre uma femea, copula-la, e, si se aproximava uma outra, da primeira saltar sobre a segunda, copulando-a em seguida. Esse fato repetiu-se por quatro vezes, sem interrupção. Geralmente a longevidade dos machos é bem menor do que a das femeas, sendo a proporção dos sexos maior nestas do que naqueles.

Juntamente com os adultos foram postos lagartas e tambem pequeno fragmento de algodão embebido numa fraca solução de agua e açucar. Esse alimento era procurado com menos frequencia. As femeas, comumente muito rapidas e ativas, saltam sobre as lagartas, firmam-se com as mandibulas, recurvam o abdomem e ferrôam-nas. Apesar de ser verificado que essa operação se realiza sobre qualquer porção da lagarta, ha evidente preferencia pelas regiões mais proximas da cabeça. Inicialmente a lagarta procura defender-se, mas depois de algum tempo permanece praticamente imovel, tempo esse que se restringe a poucos segundos quando a ferroada é dada na região posterior do labio. A paralização da lagarta, porém, não é total. Depois de imobilizada, o parasita inicia a alimentação, geralmente sobre a parte dorsal ou lateral.

A oviposição, tanto em laboratorio como nas condições naturais, é feita na região mais central do corpo, em qualquer posição. Os ovos são fixados ao tegumento em posições diversas. São brancos, levemente acinzentados; muito ligeiramente arqueados, afilando levemente para a porção caudal, sendo um pouco mais delgado na região mediana. Medem em média 0.550 mms. de comprimento por 0.162 mms. de largura, sendo as medidas maximas e minimas, respectivamente: 0.602 mms. por 0.180 mms. e 0.481 mms. por 0.142 mms.

Em média, a eclosão se verificou em 2,5 dias. O minimo de tempo necessario para o nascimento foi de 36 horas e o maximo de 4 dias. Essas variações são diretamente influenciadas pelas temperaturas.

A larva recemnascida se assemelha a uma goticula de agua. E' lisa, brilhante, levemente amarelada. Não se locomove, ficando no local antes ocupado pelo ovo. A' medida que se desenvolve adquire a côr rosea, salientando-se o sistema traqueal e notando-se um processo mamilar no ultimo segmento abdominal. O crescimento é rapido sendo necessarios 3 dias no minimo, 4,25 dias em média e 5 dias no maximo, para atingirem o completo desenvolvimento. Conseguiu-se um maximo de 12 larvas criando-se sobre uma lagarta e oriundas de uma mesma postura. Geralmente o numero de ovos por lagarta não ultrapassa 5. Foi impossivel conseguir que as larvas transferidas para outras lagartas sobrevivessem. O casulo, que é branco, é tecido comumente em dois dias; o excremento é expelido, ficando aderente á sua extremidade posterior. A transformação em ninfa geralmente se realiza um dia depois de completo o casulo e nessa fase permanece 11 dias em média. Para completar o ciclo, isto é, de ovo até adulto, foi necessaria uma média de 19 dias. O tamanho dos adultos é variavel, dependendo do numero de ovos postos sobre uma mesma lagarta. A reprodução partenogenetica foi comumente observada.

Perisierola sp.

Dentre os especimens de *P. nigrifemur* (Ashm.) enviados para identificação, foi encontrado por C. F. W. Muesebeck, do Bureau de Entomologia Norte-americana, um exemplar de uma outra especie, provavelmente, segundo a sua opinião, ainda não descrita. Possivelmente foi coletada em 20/9/937, juntamente com os adultos de *nigrifemur*. Em 5/5/938 mais tres exemplares foram encontrados, constando de duas femeas e um macho. A sua distribuição não foi constatada além do municipio de Campinas e o seu aparecimento tem sido tão limitado que não fornece elementos para julga-la de importancia como parasita da lagarta rosada. O seu comportamento parece semelhante á especie *nigrifemur*.

Microbracon vulgaris? (Ashm.) *(Hym. Brac.)*

(Estampa 17, fig. A)

Os especimens foram identificados por C. F. W. Muesebeck, que notificou haver encontrado pequenos caracteres que talvez os diferenciem do verdadeiro *vulgaris* (Ashm.).

Indubitavelmente é essa especie um dos parasitas mais importantes da *Platyedra gossypiella* (Saund.) durante o periodo compreendido entre Fevereiro e Junho. A sua área de distribuição abrange todas as zonas algodoeiras do Estado com a mesma intensidade.

Conquanto á primeira vista se possa duvidar da sua eficiencia, em vista da sua morosidade e pouco comprimento do ovipositor, essa duvida se dissipa ao verificar a sua abundancia nos algodoais e tambem a elevada quantidade de adultos obtidos do material posto em gaiolas de criação. O seu ataque é indistintamente presenciado tanto nas maçãs ainda verdes como nos capulhos infestados pela lagarta. No entanto, segundo as indicações obtidas até presentemente, parece ser mais pronunciada a preferencia pela maçã.

Essa especie pode ser facilmente criada em laboratorio. Em condições controladas a postura se realiza mais intensamente e tambem o seu ciclo de vida sofre alterações favoraveis. O aparelhamento de que dispomos presentemente não é de molde a proporcionar esse rigoroso controle, mas apesar disso vem sendo obtido relativo sucesso. A temperatura de cerca de 26° C é muito propicia ás atividades dessa especie, influindo as temperaturas abaixo de 22° C, consideravelmente, nos adultos, que permanecem inativos e em repouso.

Os adultos colocados em mangas de vidro, supridos com uma solução de agua e açucar ou agua e mel como alimentos, comportam-se convenientemente e têm uma longevidade superior a 50 dias. Os machos raramente atingem essa duração. Suspensos no interior das mangas são colocados tubos de bambú, aproximadamente de 8 cms. de comprimento por 0,5 cms. de diametro, perfurado com a ponta de um alfinete numero 4 em toda a superficie de uma faixa de 0,4 cms. Esses pedaços, rachados em duas porções iguais, são mantidos inteiriços por dois elasticos finos enrolados nas duas extremidades. As lagartas, postas avulsamente em numero médio de 5 para cada tubo, são mantidas no seu interior por meio de tampões de algodão firmemente adaptados ás duas pontas.

A copula se realiza um dia depois da emersão, sendo os machos nessa ocasião mais ativos.

Para realizar a postura a femea localiza a lagarta, introduz o ovipositor e paraliza-a totalmente. Nos tubos perfurados elas sempre procuram um dos furos para introduzir o ovipositor. No entanto pódem perfurar superficies com a resistencia de uma maçã verde.

O numero médio de lagartas atacadas por uma femea num dia é de 2,4, sendo comum a imobilização até de 8 lagartas, diariamente.

As femeas não são rapidas ao realizar a postura. Permanecem com o ovipositor dentro do local onde se acha a lagarta, durante longo tempo, quasi completamente imoveis e numa posição semelhante á que mantêm quando em repouso.

O ovo é liso, cilindrico, alongado, levemente arqueado, afilando gradativamente da porção anterior para a caudal. E' de côr branca,

translucido, brilhante. Não ha grandes variações de forma e tamanho. Suas medidas médias são de 0.953 mms. de comprimento por 0.215 mms. na maior largura, sendo as maximas e minimas, respetivamente 0.980 mms. por 0.220 mms. e 0.940 mms. por 0.208 mms. São postos indiferentemente sobre qualquer porção do corpo da lagarta ou nas cavidades onde ela se encontra. Tem-se notado que a postura por lagarta varia de 1 até 7 ovos, com a média de 1,6 ovos por hospedeiro, mas a postura diaria é em média de 2,6 ovos. E, nos casos em que o numero por lagarta não é demasiado, todos eles se criam, resultando, porém, grandes variações no tamanho dos adultos.

O periodo de incubação foi de 2 dias para 40 ovos conseguidos em Abril e Maio. Os ovos retirados diariamente dos tubos juntamente com as lagartas são colocados em placas de vidro onde todo o desenvolvimento se realiza á temperatura ambiente de 20° C médios.

As larvas recemnascidas são ativas, escorregam sobre o hospedeiro e logo principiam a alimentação. Têm cada segmento coberto por uma faixa de numerosos espinhos. Sua coloração inicialmente branca e translucida passa a rosea ou parda. Nos estadios seguintes seu corpo é aparentemente liso e brilhante, com cerdas pequenas e esparsas; o sistema traqueal é nitidamente esboçado e sua côr depende muito do estado de coloração da lagarta hospedeira.

Têm um desenvolvimento rapido e os 5 estadios se processam em 7 dias, em média.

O casulo, branco e alongado, é tecido pouco depois do completo crescimento, em 3 dias em média. Na extremidade posterior, internamente, vê-se uma mancha escura proveniente do excremento larval.

A prepupa é reconhecida prontamente e depois de permanecer de 1 a 3 dias nesse estadio, transforma-se em ninfa. Esta, inicialmente, é branca, tornando-se, depois, de ocelos e olhos pardo-avermelhados, que passam a preto. O torax toma a côr amarelo-parda e por fim esta côr se extende ao abdomen, com tonalidade mais fraca. A duração dessa fase é, em média, de 11,7 dias, aparecendo o adulto que, para sair, abre no casulo, na porção anterior e um pouco lateral, um orificio arredondado.

De ovo até adulto são necessarios 26,7 dias, em média. A proporção de machos e femeas é praticamente identica.

Microbracon sp.

(Estampa 17, fig. B)

Em regiões distintas do Estado e compreendendo os municipios de São Carlos, Piracicaba, Rio Pardo, Araraquara e Catanduva, encon-

trou-se outra especie, ainda não determinada, e que possivelmente se comporta como a especie tratada anteriormente. A sua coloração, no geral, muito se assemelha ao *Microbracon vulgaris?* sendo notadas geralmente duas manchas pretas no occiput, no meso-esterno, e tambem proximo á inserção das asas. No abdomen, no tergum dos ultimos segmentos se nota comumente uma coloração fusca. No geral é mais desenvolvido, tendo o ovipositor o comprimento de 6 mms. Os machos são de tamanhos variaveis, mas sempre menores do que as femeas.

Apanteles sp. *(Hym. Brac.)*

(Estampa 18, fig. C)

Os especimens foram considerados como possivelmente pertencentes a uma especie nova para a ciencia, por MUESEBECK, que a menciona como conhecida na nossa literatura como *A. baltazari* (ASHM.), não sendo essa a sua opinião. No periodo de Março a Julho é a especie que se apresenta, depois de *M. vulgaris?,* em maior abundancia. E' um endoparasita da lagarta. Quando a larva completa o desenvolvimento, sáe do hospedeiro e tece um casulo branco de forma oval. A crisalida, inicialmente branca, com os olhos pretos e ocelos amarelo-pardos, passa finalmente a preto. Sua duração nesta fase é de 12 dias, emergindo o adulto do casulo, em cuja extremidade abre um orificio circular.

Até presentemente não conseguimos maiores esclarecimentos sobre a especie, apesar das diversas tentativas que se vêm realizando.

Spilochalcis simillima (ASHM.) *(Hym. Chalcid.)*

Este calcidideo, constatado hospedando crisalida da lagarta em 15/6/937, foi determinado por A. B. GAHAN, do Bureau de Entomologia Norte-americano. Sua existencia é limitada e póde ser considerada como uma das especies de menor importancia. O ataque possivelmente se faz na lagarta desenvolvida, que consegue transformar-se em crisalida, mas morre antes de chegar a adulto. Sua criação em laboratório está sendo tentada atualmente, não se possuindo ainda elementos que contribuam para esclarecer a sua biologia.

Ephialtes sp. *(Hym. Ichneum.)*

Sua primeira constatação se verificou em Fevereiro de 1937, em Marilia, em crisalidas de *Diaphania hyalinata* L. colhidas na Fazenda Terra Roxa. Tais especimens foram considerados por R. A. CUSHMAN, do Bureau de Entomologia Norte-americano, como uma nova especie. Posteriormente, em 8/10/37, foi colhido em gaiolas contendo capulhos de algodão, previamente deixados por 45 dias sobre o sólo, em lugar

sombreado. Esse material foi confirmado por CUSHMAN como sendo a mesma que parasita *D. hyalinata,* especie muito proxima de *E. semisanguineus* (CRESS.). Finalmente, em Dezembro de 1937, conseguimos essa especie em gaiolas contendo capulhos sêcos apanhados num monte de restos de cultura já meio decompostos, numa fazenda do municipio de Bragança, que por qualquer circunstancia não fôra queimado.

Simples ensaios de criação em laboratorio provaram que essa especie ataca a lagarta completamente crescida, depois que teceu o casulo. Inicialmente foi muito dificil conseguir qualquer indicio de ataque á lagarta. Esta era sempre posta em suspenso dentro de mangas onde se colocaram as especies de *Ephialtes*. Ocasionalmente uma lagarta, saindo do primitivo abrigo, veio tecer o casulo na terra sobre a qual se depunha a manga. Verificou-se então que ela morrera dias depois. Por curiosidade colocamos casulos com a lagarta sobre a terra e pôde-se, então, presenciar o ataque, francamente. Por ser mais facil no momento, utilizamos daí por diante lagartas que teceram os casulos em quiabeiros *(Hibiscus esculentus)*. Esse meio foi o mais seguro e facil para conseguir as observações iniciais. Decididamente essa especie prefere as lagartas que tenham tecido o casulo no chão ou em capulhos que aí se achem. Essa conclusão se baseia no fato de que nenhum adulto foi obtido dos capulhos provenientes das plantas e sempre dos que se colhiam do chão.

A lagarta é paralizada totalmente. O ovo é posto internamente. Este é branco-sujo; cilindrico, liso, com a extremidade anterior levemente rugosa, afilando-se da porção cefalica para a caudal, ligeiramente curvado. Mede, em média, 1.392 mms. de comprimento por 0.292 mms. na maior largura e a eclosão de 5 ovos se deu em 3 dias. A larva adulta é de coloração pardo-amarelada; cabeça proeminente com antenas ligeiramente esboçada, aparelho bucal pouco visivel; segmentos do corpo pouco definidos; é mais estreita na região toraxica, avolumando-se gradualmente até o 5.º segmento abdominal; daí em diante vae-se reduzindo levemente e a extremidade caudal é arredondada.

O crescimento de ovo a adulto para 6 exemplares se verificou em 16 dias, emergindo este da propria lagarta, por um orificio feito na região toraxica.

Calliephialtes dimorphus CUSHM. *(Hym. Ichneum.)*

(Estampa 18, fig. D)

Do periodo compreendido entre Julho até o fim da permanencia dos restos da cultura no campo, essa especie é indubitavelmente a mais abundante e a de maior importancia como parasita primario da lagarta

rosada. A primeira constatação pelo autor foi feita em 5 de Maio de 1937, em capulhos colhidos no municipio de Campinas e conservados em gaiolas.

Inicialmente pouco abundante, torna-se depois muito frequente. O material obtido em 9 de Outubro e remetido para o Bureau de Entomologia Norte-americano foi considerado por R. A. CUSHMAN, como especie nova para a ciencia, e a sua descrição original foi recentemente divulgada na «Revista de Entomologia», Rio de Janeiro, vol. 9, p. 12.

Devido á época em que o aparecimento dessa especie é mais abundante, isto é, nos meses em que os restos de cultura estão para ser arrancados ou queimados, a sua importancia, possivelmente entre nós, é bem diminuida, pois essas operações limitam a sua atividade. O seu ataque é restrito ás lagartas plenamente desenvolvidas, cujo orificio de saida já tenha sido feito, porque o inseto não consegue perfurar superficies mais resistentes. A sua eficiencia é proeminente principalmente nos campos onde as soqueiras não são eliminadas. Apesar de se verificar a sua existencia nos algodoais até Janeiro, esse numero é infimo em relação ao que se observa durante o periodo postcultural. Naturalmente essa circunstancia relaciona-se com as condições em que a lagarta se encontra nos primeiros meses da cultura.

A sua distribuição é extensiva a todas as zonas algodoeiras do Estado, aproximadamente com a mesma intensidade.

Em Agosto de 1937 foi obtida uma femea adulta de *Calliephialtes dimorphus* parasitando *Myelois decolor* ZELLER (FORBES det.) que atacavam grãos de café provenientes de Ribeirão Preto e endereçados ao Dr. E. J. HAMBLETON.

Em laboratorio tem sido possivel conseguir o ciclo sobre *Leucinodes elegantalis* GUEN. Essa especie é muito facil de ser manuseada, prestando-se muito para criação em laboratorio.

A maneira de obter a postura em cativeiro é muito semelhante a já mencionada para *M. vulgaris?* (ASHM.).

A copula póde ser observada pouco depois da emersão do adulto. Geralmente tem a duração aproximada de 100 segundos. O periodo médio de preoviposição é de 12 dias. A proporção dos sexos do material colhido no campo é praticamente a mesma, fornecendo a criação em laboratorio geralmente maior porcentagem de machos. A longevidade das femeas é comumente de 34 dias; os machos geralmente não vivem mais de 18 dias. Tanto os machos como as femeas são muito ativos. A postura se realiza francamente até na semi-obscuridade. A temperatura média de 26° C é-lhes muito propicia, porém em temperaturas compreendidas entre 20 e 30° C os adultos parecem não ter sido muito influenciados.

A oviposição, em média, é de 8 ovos por dia para um total de 30 femeas. São comuns, para casos isolados, posturas até de 19 ovos diarios. Os ovos são postos sobre a lagarta ou em qualquer ponto da célula ocupada por ela. Em laboratorio, o numero variou de 1 até 5 ovos por lagarta, porém sómente um consegue chegar á forma adulta. As lagartas são utilizadas não só para a postura como para a alimentação. A solução de agua e açucar poucas vezes é procurada. As femeas matam seja para realizar a oviposição, seja para alimentação, até 20 lagartas diariamente, sendo comum matarem de 15 a 18.

Quando atacam uma lagarta, são rapidas e nervosas. Depois de paraliza-la completamente, o que é feito numa unica ferroada, mas que comumente é muitas vezes repetida, fica em repouso o tempo suficiente para a postura, que se verifica em poucos segundos. Retiram em seguida o ovipositor e procuram nova lagarta. E' muito comum que depois de uma procura, volte novamente á mesma, e realize nova postura. No campo as femeas procuram outras lagartas e não se verificou tal reincidencia.

Para se alimentar a femea ferrôa e paraliza a lagarta e vagarosamente retira o ovipositor. Nessa operação vem puxando a lagarta lentamente para o orificio. Retirando o ovipositor, rapidamente se volta e com o aparelho bucal procura pegá-la. Se não o consegue, repete mais vezes a operação, até que isso lhe seja possivel. Algumas vezes a abertura é muito pequena; nesse caso a femea dilata com as mandibulas o orificio até que consiga pegar a lagarta e alimentar-se. Comumente de 3 a 5 lagartas são sacrificadas por dia para esse fim. Os machos alimentam-se das lagartas já comidas pelas femeas. Uma femea sempre defende o local onde existem as lagartas que estão sendo atacadas, evitando que outros adultos se aproximem. E' possivel que quando uma femea deixa o lugar, outra o ocupe e se comporte então como a primeira.

O ovo recemposto é branco translucido, cilindrico, alongado, geralmente arqueado, afilando para a extremidade caudal mais suavemente e para a cefalica mais abrutamente; chorion com muitas pontuações salientes dispostas em linhas, mais ou menos uniformes e semelhantes a estrias. Durante o desenvolvimento do embrião as duas extremidades murcham. Têm em média 1,984 mms. de comprimento por 0.284 mms. na maior largura, não havendo grandes variações na forma e tamanho.

O periodo de incubação completa-se na média de 2 dias. Os ovos retirados diariamente e postos sobre lagartas eram mantidos no interior de células feitas em pedaços de caules verdes de algodão e sujeitos á temperatura ambiente, cuja média atingia a 19° C.

As larvas recemnascidas logo iniciam a alimentação. São brancas, translucidas, com a cabeça em forma de dedal; antenas muito proeminentes. Cerdas delicadas e esparsas. Nos estadios seguintes apresentam coloração rosea. O corpo, visto com grande aumento, possue intensa pilosidade, além das cerdas esparsas. Têm rapido crescimento. Da eclosão do ovo até a construção do casulo foram precisos 6 dias, em média. O casulo é pardo-amarelado, resistente. E' tecido pouco depois do completo desenvolvimento larval e a duração da construção é aproximadamente de 2 a 3 dias, em média. A prepupa, de côr creme, observa-se 3 dias depois de concluido o casulo e tem a duração média de 2 dias. A ninfa, inicialmente branca, passa a creme, tomando a seguir uma coloração alaranjada e finalmente adquire côr semelhante á do adulto. Esta fase tem a duração aproximada de 11 dias. O adulto emerge fazendo no casulo uma abertura circular. De ovo a adulto, são necessarios 23 dias. As femeas cuja variação em tamanho não é muito constante, são geralmente maiores que os machos, nos quais essa diversidade é muito comum.

Encyrtidae — Em Agosto de 1937 certa quantidade de quiabos *Hibiscus esculentus* foram colhidos para verificação da hibernação da lagarta rosada nesse hospedeiro. Durante as observações que se realizavam periodicamente, muitos frutos foram abertos e examinados. Num deles, em 20/9/937, encontrou-se uma lagarta completamente desenvolvida em cujo interior se acharam 11 ninfas de um Encyrtideo, que não puderam ser identificados precisamente. A. B. GAHAN, do Bureau de Entomologia Norte-americano, considera-as de genero proximo a *Cerchysisius* WESTWOOD.

Essas ninfas, mortas, de coloração escura com brilho metalico, estavam prestes a transformar-se em adultos. Até presentemente não conseguimos outros exemplares desse parasita interno da lagarta rosada.

OUTRAS ESPECIES DE PARASITAS OBTIDOS EM GAIOLAS DE CRIAÇÃO

Todas as especies de himenopteros parasitas encontrados nas gaiolas de criação, onde se colocaram os capulhos de algodão, foram indistintamente colhidos, desde que, de qualquer forma, possuiam determinada relação com os insetos geralmente encontrados nesses capulhos. Não foi nossa preocupação determinar os seus verdadeiros hospedeiros e o acrescimo desta nota ás informações anteriores visa tão sómente assinalar as especies comumente observadas. A primeira constatação é oriunda do municipio de Campinas; no entanto a sua distribuição se extende geralmente a outras regiões do Estado.

São as seguintes: *Eupelmus cushmani* Crawford (col. 20/V/37); *Zeteticontus* sp. (col. 18/X/37); *Zatropis incertus* (Ashm.) (col. 25/IX/37); *Tetrastichus chapadae* Ashm. (col. 14/X/37) — A. B. Gahan, det. — *Cephalonomia* sp. (col. 6/X/37); *Telenomus* sp. (col. 14/X/37); duas especies de *Heterospilus* (col. 11/X/37); *Eubadizon* sp. (col. 6/X/37) — C. F. W. Muesebeck, det. — *Neorhacodes* sp. (col. 25/IX/37) — R. A. Cushman, det. —.

Geralmente nas gaiolas, além da *Platyedra gossypiella,* encontravam-se grandes quantidades de *Pyroderces rileyi* (Wals.), *Araeocerus fasciculatus* (De Geer), *Oxycarenus hyalipennis* (Costa) e ainda um *Psocidae* muito comum, não identificado.

A dedicação, o auxilio e o interesse invulgar demonstrados pelos Snrs. José Rubens Pares Machado e Benedito L. Ribeiro, nos trabalhos que se vêm realizando, merecem, com os agradecimentos do autor, destaque especial.

NATURAL ENEMIES OF "PLATYEDRA GOSSYPIELLA (Saunders)" IN THE STATE OF SÃO PAULO, BRAZIL.

DEPREDATING WASPS AND SPECIES OF PARASITES WITH NOTES ON THEIR BIOLOGY.

Abstract

In this paper are presented notes on the biology of the most important species of predators and primary parasites of P. gossypiella occuring in cotton fields of the State of São Paulo, Brazil. Records on several other microhymenoptera taken in cages containing cotton bolls are also mentioned.

Fig. *A* — *Microbracon vulgaris?* (ASHM.) ♀ × 6,6
(A. Federman, fot.)

Fig. *B* — *Microbracon* sp. ♀ × 5,0 (A. Federman, fot.)

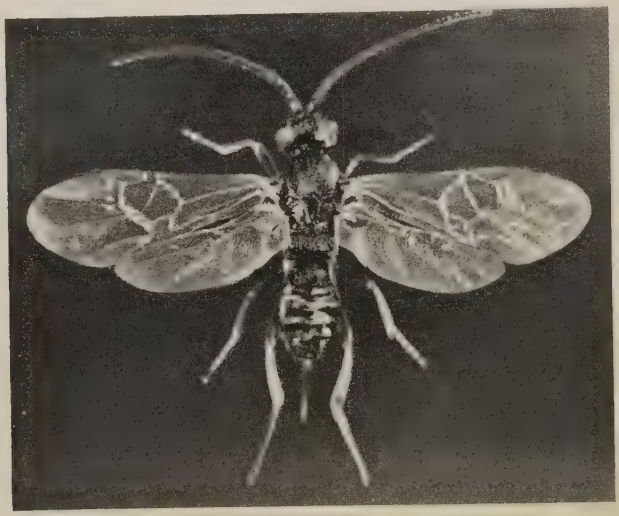


Fig. *C* — *Apanteles* sp. ♀ × 11,2 (A. Federman, fot.)

Fig. *D* — *Calliephialtes dimorphus* CUSHM. ♀ × 3,7
(A. Federman, fot.)

Vol. 9 — Art. 19 Novembro de 1938

A OCORRENCIA DO ÁCARO TROPICAL "TARSONEMUS LATUS BANKS", (ACAR. TARSONEMIDAE). CAUSADOR DA RASGADURA DAS FOLHAS NOS ALGODOAIS DE S. PAULO

POR

E. J. Hambleton

Do Instituto Biologico de S. Paulo

Com 3 figuras no texto e estampas 19-23

INTRODUÇÃO

Muitos algodoais do Estado de S. Paulo sofrem, desde alguns anos, consideraveis prejuizos, devido a uma especie de Acarina até agora desconhecida e aparentemente nova para o Brasil. Dado o tamanho muito pequeno deles, e em virtude de viverem principalmente nas paginas inferiores das folhas, esses ácaros escapam á atenção da maioria dos lavradores. Contudo a sua ação sobre o algodoeiro é muito caratteristica e a sua existencia póde ser presenciada na maioria dos algodoais. No entanto, apesar dessa constancia ser generalisada durante a cultura, não foi até agora observado caso em que a sua intensidade e prejuizos fossem tais que justificassem o emprego de inseticidas.

Ha pelo menos quatro especies de ácaros comumente encontrados em algodoeiros deste Estado. Destes, talvez o ácaro vermelho, *Tetranychus telarius* L. seja o mais conhecido, ocorrendo numa grande variedade de plantas, cultivadas ou não. O ácaro predador, *Pediculoides ventricosus* NEWPORT ataca várias especies de insétos prejudiciais ao algodoeiro. Uma outra especie, igualmente predadora, muito difundida e ainda indeterminada, é comum na ultima fase da cultura. Contudo, até agora o ácaro tropical *Tarsonemus latus* BANKS é a especie economicamente mais importante dentre as que se encontram sobre os algodoeiros.

HISTORICO

A primeira infestação por esse ácaro nos algodoais foi observada pelo autor durante uma inspeção que fez em Março de 1935, no Municipio de Araras. Um exame das folhas mais velhas e mais prejudicadas não revelou, no entanto, a presença dessa especie, embora ela fôsse observada atacando intensamente as folhas mais novas, não tendo sido possivel nessa ocasião estabelecer definitivamente si sómente os ácaros eram os responsaveis por todo o prejuizo verificado. Mais ou menos na mesma época BITANCOURT (1935), que descreveu essa moda-

lidade de dano ao algodoeiro sob o nome de rasgadura das folhas, ainda não tinha certeza quanto ao agente causador. Contudo mencionou que uma grande quantidade de pequenos ácaros podiam ser vistos nas plantas doentes e particularmente nas folhas novas, e atribuiu a tais ácaros a possibilidade de serem os provocadores desses prejuizos.

A especie que determina esses estragos nos algodoeiros do Estado de S. Paulo, foi identificada por Dr. H. E. Ewing, do Museu Nacional dos Estados Unidos, Washington, D. C. como o ácaro tropical *Tarsonemus latus* Banks, pelo que o autor agradece.

DISTRIBUIÇÃO

Por muitos anos, depois da descrição de Banks (1904), esse ácaro foi considerado uma especie tropical, sendo conhecida a sua existencia nas Ilhas Virgens, Florida e nas estufas de Washington, D. C.. Garman (1929) refere-se a ele como prejudicial nas estufas do Estado de Connecticut, Estados Unidos. Os estudos realizados por Smith (1933) salientam o fáto de ter sido encontrado muito distribuido em regiões do paiz, muito afastadas. Esse autor crê que essa grande difusão do ácaro tropical indica que a especie provavelmente existe nas estufas ha muito tempo mas tem sido confundida com a especie muito proxima, *Tarsonemus pallidus* Banks.

Quanto á distribuição de *T. latus* no Brasil, muito pouco é conhecido fóra do Estado de S. Paulo. Em Julho deste ano a sua presença foi observada por H. Sauer sobre dálias, no Estado do Espirito Santo. Em vista da sua distribuição ser muito generalizada em S. Paulo, póde-se conceber que ocorra sobre territorio mais amplo, nessa mesma latitude.

Nas zonas central e suéste de S. Paulo o seu aparecimento é mais frequente e os algodoeiros sofrem maiores prejuizos do que nas zonas de desenvolvimento da cultura mais recente, como a Noroéste.

PLANTAS HOSPEDEIRAS

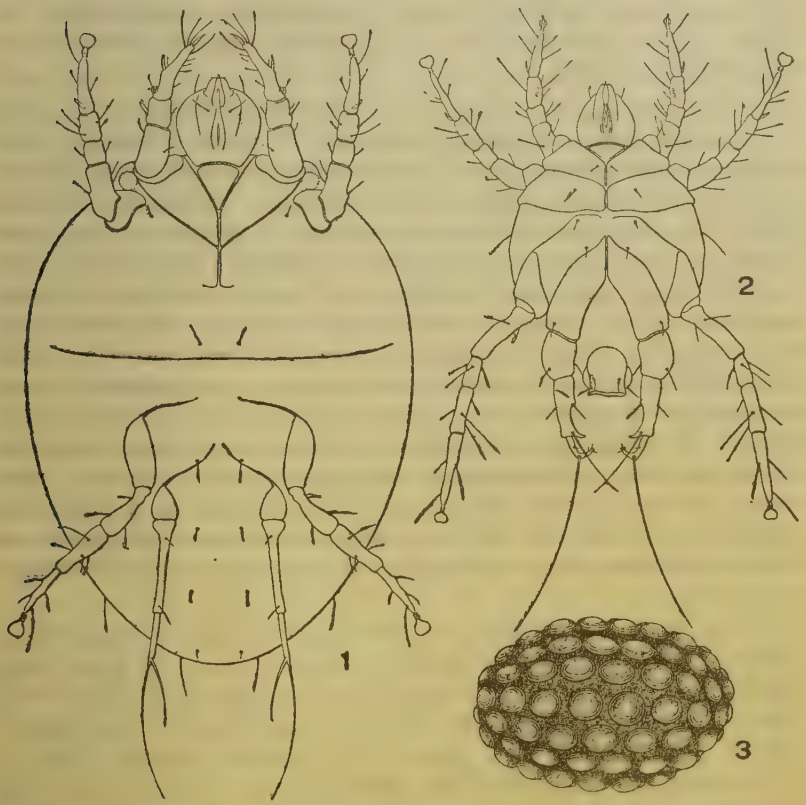
Além do algodoeiro *(Gossypium hirsutum)* o autor achou o ácaro tropical sobre pimentão *(Capsicum annuum)*, dálias *(Dahlia* sp.*)* e zinias *(Zinnia elegans)*.

Uma pequena cultura de pimentão plantada nas proximidades de um algodoal estava tão intensamente atacada, que não produziu um unico fruto vendável. Foi observado que as folhas das dálias de jardins, e algumas vezes zinias, estavam atrofiadas e deformadas em virtude do ataque dos ácaros. Observações e colétas posteriores aumentarão indubitavelmente o numero de hospedeiros, pois Smith (1933)

dá uma lista de 49 plantas atacadas por *Tarsonemus latus* nas condições das estufas, nos Estados Unidos. Embora a maioria dessas plantas ornamentais tambem existem aqui em S. Paulo, outras que ele anóta, tais como citrus, batata doce, tomate, fumo, manga, abacate, feijão e beterraba, poderão eventualmente tornar-se perseguidas pelos ácaros em virtude das condições que existem neste paiz.

DESCRIÇÃO DOS ESTADIOS

O ácaro tropical (figs. 1-3), praticamente invisivel a olho desarmado, antes de atingir o estado adulto, passa pelas fáses de ovo, de larva e de «pupa».



Tarsonemus latus BANKS. Fig. 1 — Femea, vista ventral, × 500. Fig. 2 — Macho, vista ventral, × 500. Fig. 3 — Ovo, vista dorsal, × 500. (A. R. Mazza, del.).

O ovo méde aproximadamente 0,102 mms. de comprimento por 0,072 mms. de largura; tem a côr de perola, com linhas de manchas brancas na superficie, semelhantes a bulbos delicados; á primeira vista é de forma arredondada e fica geralmente achatado sobre a superficie da folha.

A larva tem, ao nascer, 6 patas: 2 pares situados proximos á cabeça e o terceiro na metade posterior do corpo. E' de côr esbranquiçada. Quando completamente desenvolvidas, as larvas são robustas, mais compridas do que largas e opacas ou de coloração esbranquiçada. Medem aproximadamente 0,148 mms. de comprimento por 0,088 mms. de largura.

A «pupa» tem a côr semelhante á das larvas: é mais larga proximo da região anterior e se afila para ambas as extremidades. A «pupa» da femea mede cerca de 0,152 mms. de comprimento por 0,098 mms. de largura.

A femea adulta tem a côr variando de branca a ambar ou a pardacenta, com o tegumento brilhante. O corpo é curto e largo, estreitando gradualmente para a extremidade posterior e com poucas cerdas nas duas faces. Tem 4 pares de patas, todos com numerosas cerdas. Os primeiros 2 pares estão situados na porção anterior, junto á cabeça, e os terceiro e quarto pares na metade posterior do corpo. Todas as patas, excéto as do quarto par, terminam em uma estrutura semelhante a uma vesicula fortemente quitinizada na base e ao longo dos lados. Em adição, o primeiro par de patas tem, um pêlo grande e 2 pequenos de forma clavada e uma garra mediana simples e bem desenvolvida; o segundo par é igualmente provido de um grande pêlo clavado. O quarto par é reduzido a uma estrutura simples e alongada, tendo cada pata, na extremidade distal, uma cerda comprida e outra curta. Este par não é usado quando o ácaro caminha e permanece estendido para traz. As femeas adultas variam muito em tamanho e médem aproximadamente 0,176 mms. de comprimento por 0,118 mms. de largura.

O macho adulto é muito menor do que a femea: seu corpo é mais estreito e a extremidade do abdomen é muito mais afilada e levantada. E' geralmente de coloração mais fraca. Nos demais caracteres, assemelha-se á femea. Como nesta, o seu primeiro par de patas tem um pêlo grande e 2 pequenos clavados, porém a garra mediana é pequena e pouco definida. No segundo par de patas ha tambem um grande pêlo clavado. Como na femea, o quarto par de patas não é usado. Este é maior e a sua estrutura é diferente da

dos outros pares de patas; o segmento terminal é curvado e as cerdas são de tamanho variavel. Os machos médem cerca de 0,146 mms. de comprimento por 0,082 mms. de largura.

HISTORIA DA VIDA

Os estudos sobre a vida do *Tarsonemus latus* foram realizados em laboratorio durante Janeiro e Fevereiro, sob temperaturas médias que variaram entre 26° C e 28° C. Para fins de criação, femeas ou «pupas» de femeas foram reunidas aos machos e isoladas em micro-camaras feitas de celuloide e feltro e adaptadas sobre folhas de algodoeiros. A cópula verificou-se quasi imediatamente após o nacimento das femeas adultas e a oviposição iniciou-se geralmente no dia imediato. Os ovos são postos isoladamente, ficando geralmente achatados sobre a superficie inferior da folha. Até o fim do segundo dia, a contar do em que a femea atingiu a forma adulta, 4 ou 5 ovos foram depositados por individuo. A postura é mais intensa durante os 4 ou 5 primeiros dias. As femeas isoladas nas camaras depositaram uma média de cerca de 5 ovos por dia, depositando uma delas 21 ovos durante a vida. Nas condições naturais de temperatura e humidade é possivel que esse numero seja mais elevado. A incubação de 38 ovos variou de 1 a 3 dias, na temperatura média de 27° C durante o mês de Janeiro. Em identica temperatura o periodo larval completou-se aproximadamente no mesmo tempo, com a duração média ligeiramente superior a 2 dias. Durante as 8 a 10 primeiras horas as larvas jovens movem-se mais lentamente, tornando-se mais ativas á medida que atingem a maturidade. Quando bem desenvolvidas, permanecem em repouso, o tegumento separa-se formando o involucro pupal alongado, o qual se afila para ambas as extremidades. Dentro desse involucro aparece no individuo um quarto par de patas, posteriormente ao terceiro par da larva. A forma «pupal» fica em repouso por 1 a 2 dias, algumas vêzes menos do que 24 horas, e em seguida o adulto aparece. Em condições favoraveis uma geração completa póde ser obtida em 3 dias somente e não mais do que 5 dias são necessarios para obtel-a em laboratorio. Cinco pupas de femeas provenientes de ovos postos em 21 de Janeiro foram isoladas com machos no dia 25. Todas elas se transformaram em adulto, principiando a oviposição no dia seguinte, indicando assim que o desenvolvimento de ovo até ovo póde ser realizado em 5 dias. Desde o aparecimento dos primeiros ácaros no algodoal, considerando a extensão do seu ciclo de vida, póde-se facilmente supôr que ocorrem na cultura, durante um ano, de 18 a 20 gerações. Em vista, portanto, do numero de

gerações que se pódem verificar, muitos danos são provocados desde Dezembro a Fevereiro, época em que a sua multiplicação é muito mais rapida.

HABITOS DO ÁCARO

Tal como a especie *T. pallidus*, o ácaro tropical procura evitar a luz, confinando-se quasi inteiramente á superficie inferior das folhas. Mostra preferencia pelas folhas novas e mais pubescentes, e é observado nas extremidades mais tenras dos caules em crecimento. No entanto póde ser achado em maior numero, alimentando-se da superficie inferior das folhas já estendidas.

Os ácaros são muito ativos e pódem ser observados movendo-se rapidamente de um lugar para outro. Os machos são muito menores, mais ativos e têm patas mais compridas do que as femeas. Empregam pouco tempo para a alimentação e correm ligeiramente sobre a superficie da folha. Um habito comum dos machos é o de carregar as «pupas» das femeas por algumas horas antes delas se transformarem em adulto. Não se observou si os machos levantam as pupas da mesma maneira como foi descrito por SMITH e GOLDSMITH (1936) para os machos de *T. pallidus* em que o quarto par de patas é usado como pinça. Os machos de *T. latus* carregam a sua «pupa» segurando-a acima do corpo, numa posição transversal, servindo a extremidade posterior do abdomen para sustenta-la firmemente nessa posição. Esse habito de carregar as «pupas» evidentemente auxilia a sua disseminação mais rapidamente e ao mesmo tempo concorre para que haja certa garantia na propagação da especie.

Dado o seu tamanho, muito pequeno, esses ácaros não são observados sem a ajuda de uma lente. Por isso pódem facilmente ser disseminados depois de se estabelecerem num algodoal. Durante as culturas os trabalhadores, passando entre as fileiras, podem disseminar os ácaros, que pódem ainda ser disseminados por certos insétos, animais, ventos ou chuvas. A disseminação natural verifica-se quando a folhagem de uma planta toca a da outra, e isso permitirá que esses ácaros sejam distribuidos por todo o algodoal. Indubitavelmente existem nesses campos numerosas outras plantas hospedeiras, capazes de abrigar a especie e de onde ela migra para os algodoais. Nossas observações mostram que a infestação é geralmente mais intensa nas fileiras marginais do campo, ou fileiras sombreadas, onde outra vegetação possa suprir os ácaros com alimento ou abriga-los, ou ainda, talvez, provê-los com condições de temperatura e humidade ideais. Os ácaros tornam-se mais abundantes nos algodoeiros de fins de Dezembro a Fevereiro, coincidindo essa época com as chuvas mais fortes e temperaturas mais elevadas.

A reprodução dos ácaros continúa até depois da colheita, mas, nessa ocasião tornam-se muito escassos. Machos e femeas, além de ovos, foram colhidos no algodoal até o mês de Agosto (meio do inverno), quando a média de temperatura é cerca de 17° C, e somente com buscas cuidadosas é que eles pódem ser achados depois dessa época. Por isso, a criação parece que continúa através o ano todo, si os algodoeiros permanecerem no campo.

APARENCIA GERAL E NATUREZA DOS PREJUIZOS

A presença do ácaro é inicialmente revelada por uma aparencia brilhante, na face inferior da folha. Este sintoma póde ser acompanhado muitas vêses por uma ligeira ondulação das folhas, cujas margens se dobram um pouco, para cima. O prejuizo resultante da alimentação dos ácaros sobre a epiderme tenra prejudica o crecimento e expansão normal da superficie inferior e, á medida que vão ficando mais velhas, as folhas tornam-se espessas e coriaceas e as margens enrolam-se para baixo. As folhas intensamente atacadas ficam resequidas e quebradiças; a epiderme da superficie inferior perde a côr esverdeada, tornando-se pálida ou ás vêses pardacenta, e com muitas rutúras pequeninas, praticamente em toda a sua extensão. Finalmente as folhas partem-se nas areas situadas entre as nervuras e assumem um aspéto de folhas rasgadas. Nesta condição os sintomas dos estragos são mais pronunciados e as folhas tomam a aparencia que póde ser apreciada nas fotografias que ilustram o presente trabalho. Quando esses sintomas são verificados, geralmente os ácaros já não são encontrados nessas folhas e sim nas partes mais novas, devido á condição daquelas tornar-se inadequada á vida da especie. Quando o ácaro se alimenta dos caules novos ou peciolos, observam-se estragos identicos aos que se mencionaram para a superficie inferior da folha; aparecem, mais tarde, manchas irregulares com a coloração parda sobre a casca onde o ácaro causou o rompimento da epiderme, sendo notado um aspéto rugoso.

A menos que o algodão seja plantado muito tarde, não é provavel que grandes prejuizos possam ser causados á planta nas primeiras fases do crecimento. Na estampa 20, fig. C, mostra-se um pequeno algodoeiro com todas as folhas seriamente atacadas pelo ácaro tropical. Neste caso as folhas formadas mais cedo ou as que se notam na porção mais baixa da planta foram atacadas quando o algodoeiro era muito pequeno. E, si as plantas novas são intensamente perseguidas, ficam muitas vêses raquiticas e sua produção é inferior.

Os sintomas carateristicos dos prejuizos causados por essa especie de ácaro no pimentão são parecidos com os produzidos no algo-

doeiro, excéto no que concerne ás folhas mais velhas que, nesse caso, ficam com as margens mais enroladas ou curvadas para baixo. Ha tambem um impedimento do crecimento dos brótos terminais, o que determina a formação de tufos de pequenas folhas de formas anormais. Os frutos atacados pelo ácaro geralmente ficam pequenos, muito retorcidos e com areas irregulares, com a casca muito aspera, de coloração pardacenta. As folhas de dálias, quando atacadas, mostram os mesmos sintomas, desenvolvendo-se as muito novas anormalmente, e ficando logo enroladas e retorcidas.

DISCUSSÃO DAS MEDIDAS DE COMBATE

Devido á incerteza sobre si o tempo ou outros fatores pódem favorecer as atividades do ácaro de modo a causar um aumento nas perdas das lavouras, os tratamentos para combate-lo só poderão ser considerados nos casos em que se torne necessario o seu emprego. Ha um periodo, durante Dezembro e Janeiro, em que a cultura é muito suscetivel ao ataque dos ácaros. Isso deixa transparecer que si se empregarem pulverizações adequadas com inseticidas por contáto, nessa época os resultados poderão ser muito valiosos.

Nas condições das estufas, SMITH (1933) sugére o uso de enxofre finamente pulverizado, por ele considerado, segundo as experiencias de laboratorio, o produto mais eficaz contra o ácaro tropical. Esse inseticida seria utilizado na forma de um pó e aplicado nas superficies inferiores das folhas, quando estivessem secas. 30 a 40 quilos por alqueire dessa flôr de enxofre finamente pulverizada, usados em cada aplicação, dariam bons resultados.

THE OCCURENCE OF THE TROPICAL MITE "TARSONEMUS LATUS BANKS" IN COTTON FIELDS OF SÃO PAULO (BRAZIL).

Abstract

The occurence of the tropical mite Tarsonemus latus BANKS, *causing serious injury to cotton plants, is reported for the first time from the State of São Paulo. Although the damage caused by these mites has been known for several years the species had not been identified until quite recently. The present known distribution of the species includes the Virgin Islands, Washington, D. C., Florida, Connecticut and other widely separated areas of the United States. In Brazil, the mite is known to occur only in the States of São Paulo and Espirito Santo.*

The mite has been reported to feed on some 49 different plants. Besides cotton, it has been found causing injury to peppers, dahlias and zinnias in S. Paulo.

The mites reproduce rapidly, only 3 to 5 days being required to complete one generation. Most damage occurs during the warm, rainy season when mites are present in greatest numbers.

Feeding by the mites is confined almost entirely to the lower leaf surface where they are most commonly found. Their feeding causes cotton leaves to become rigid and rolled under at the edges. With age, the leaves may split or crack open, assuming a ragged appearance of various shapes.

It is possible that reproduction may continue through the winter months since all stages of the mite have been found as late as August.

Finely powdered sulfur applied as a dust is suggested as a means of control.

BIBLIOGRAFIA

1 — Banks, N. — 1904 — *Jour. N. York Entomological Society,* **12,** 55.

2 — Bitancourt, A. A. — 1935 — Doenças do algodoeiro. *O Biologico,* São Paulo, **1,** 157-159.

3 — Garman, P. — 1929 — A new greenhouse pest. *Conn. Agr. Exp. Sta. Bull.,* **305,** 765-766, figs.

4 — Smith, F. F. — 1933 — The cyclamen mite and the broad mite and their control. *U. S. Dept. Agr. Cir.,* **301,** 1-13, figs.

5 — Smith, L. M. and Goldsmith, E. V. — 1936 — The cyclamen mite, Tarsonemus pallidus, and its control on field strawberries. *Hilgardia,* **10,** 53-94, figs.

Fig. *A* — Folhas de algodoeiro mostrando varios tipos de prejuizos causados pelo ácaro tropical *Tarsonemus latus.* (Autor, fot.)

Fig. *B* — Parte dum caule de algodoeiro, mostrando os prejuizos do ácaro na casca. (Autor, fot.)

Fig. *C* — Um algodoeiro seriamente atacado por ácaros, mostrando os sintomas caracteristicos dos prejuizos resultantes. (Autor, fot.)

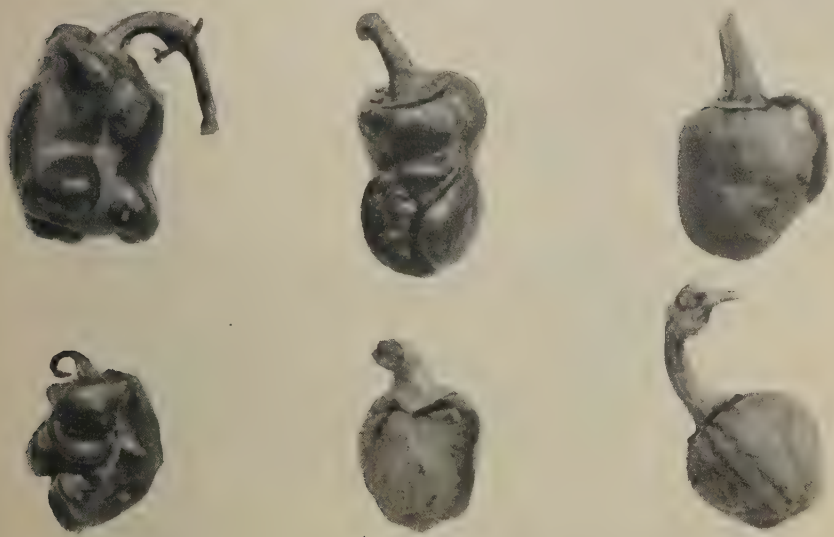


Fig. *D* — Pimentões seriamente prejudicados pelo *Tarsonemus latus*. (Autor, fot.)

Fig. *E* — Vista parcial duma pequena plantação de pimentão, mostrando os prejuizos resultantes do ataque pelos ácaros. (Autor, fot.)

Fig. *F* — Uma planta mostrando os efeitos duma forte infestação do ácaro tropical. Tais plantas não produziram um unico pimentão vendavel. (Autor, fot.)

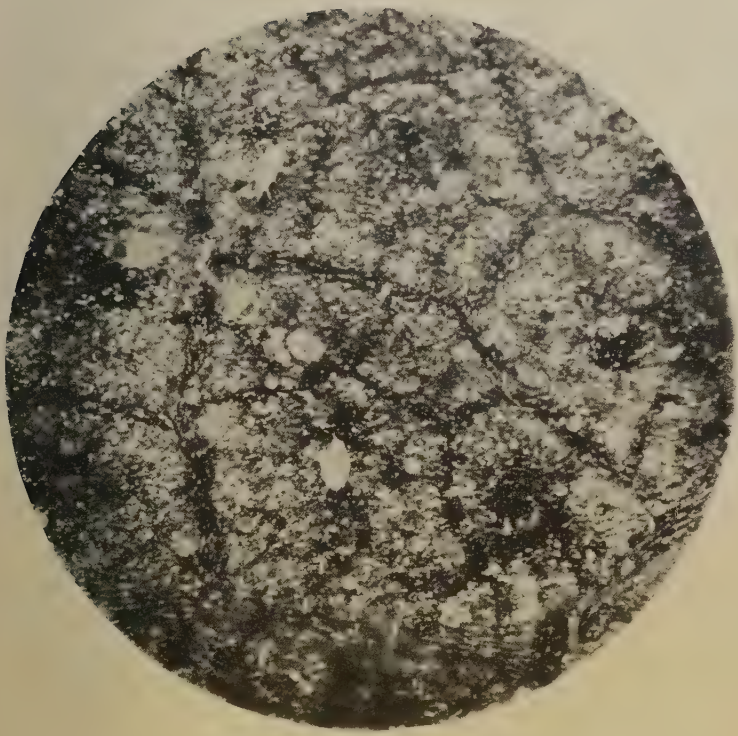


Fig. *G* — Ovos e «pupas» do ácaro tropical *Tarsonemus latus*, numa folha de algodoeiro. × 60. (Federman, fot.)

Vol. 9 — Art. 20 Novembro de 1938

O CASCUDO DOS AÇUDES NORDESTINOS
"PLECOSTOMUS PLECOSTOMUS"

POR

P. de Azevedo

Da Comissão Técnica de Piscicultura do Nordeste

Com 17 figuras no texto e estampa 24

Sinopse sistematica e nomenclatura popular — Os cascudos são peixes sobejamente conhecidos, não só pelo seu aspecto externo como tambem pela sua frequencia em quasi todas as aguas brasileiras. A especie cujo estudo nos propomos fazer no presente trabalho, *Plecostumus plecostomus* L., pertence á subfamilia *Plecostominae* que faz parte da familia *Loricariidae*. Ela se aproxima bastante de duas outras especies: *P. pusarum* STARKS e *P. carvalhoi* M. RIBEIRO, ambas existentes no Nordeste. Conhecido de norte a sul do Paiz, recebeu o *Plecostomus* as mais variadas denominações regionais. No Amazonas é conhecido pelo nome de «acarí»; «bóde» ou «bobó» chamam-no no Nordeste; nos Estados centrais conhecem-no por «cascudo», e mais no sul, nas fronteiras com os nossos vizinhos platinos, o seu nome é «vieja».

Habitat e pesca — O cascudo prefere viver em lugares pedregosos, proximos ás cachoeiras ou quedas dagua. Seus labios comportando-se quasi como uma ventosa, auxiliam-no a prender-se nas pedras e resistir á força da correnteza. Não obstante essa preferencia pelos lugares pedregosos, onde as aguas correm com mais violencia, adaptou-se perfeitamente ás aguas represadas do nordeste e sul do Paiz, podendo ser encontrado em quasi todas as bacias dos rios brasileiros. Costuma meter-se nas «lócas» e furnas das pedras, de onde raramente se afasta (*).

Para sua pesca são usadas as tarrafas, rêdes e até «á mão» são apanhados nas lócas, para o que, ás mais das vezes, precisa o pescador mergulhar. Outro sistema de pesca usado no Nordeste, para colher não só os cascudos, mas tambem a traíra, *Hoplias malabaricus,* o «jejú» ou «iú», *Hoplerythrinus uniteniatus,* e o acará, *Cichlasoma bimaculatum,* isto é, os peixes de habitos mais lentos, é o conhecido pelo nome de «choque». Chama-se choque a armadilha de que se serve o pescador e que consiste numa série de varetas amarradas umas ás outras, de

(*) A esse habito de cascudo se deve a crença, mais ou menos generalizada, pela qual esse peixe é apontado como furador de barragens, o que parece não passar de simples lenda, pois o seu revestimento externo não é bastante forte nem os aculeos das peitorais têm a resistencia necessaria para se comportarem como perfuratrizes.

forma a constituir um tronco de cone de base inferior. Com esse apetrecho, vai o pescador pelas margens dos açudes a bater aqui e acolá: após cada batida, enfia o braço pela abertura superior da armadilha afim de verificar se algum peixe ficou preso entre as varetas e o fundo do açude. Este sistema de pescar é dos mais primitivos e só póde dar resultado apreciavel nas mãos de um pescador que, além de conhecer bem os habitos das especies, trabalhe em aguas muito piscosas.

Alimentação — O regime alimentar deste peixe é muito especializado, pois êle se alimenta exclusivamente de algas. O exame do conteúdo do estomago de cascudos sempre revelou numerosos detritos organicos mal diferenciados, pequenos grãos de areia e grande quantidade de Diatomaceas, predominando as do tipo *Naviculacea* e Flagelarias, alguns protozoarios do tipo Flagelata e tambem alguns *Botriococcus*. Os habitos do cascudo estão perfeitamente de acordo com o seu regime alimentar. Vive entre as pedras, tócos e lócas porque aí se acumulam, de preferencia, as algas. A sua predileção pelas algas é tal que, quando presos em aquarios durante algum tempo não trepidam em raspar os corpos de outros peixes recem-pescados e que morrem logo depois de colocados nesses aquarios. Foi o que observámos varias vezes quando depositavamos curimãs, *(Mugil curema)*, nos aquarios dos cascudos. Certamente aquelas traziam, prezas ás escamas, certa quantidade de algas. As larvas do cascudo, desde o primeiro dia de vida livre, atiram-se ás algas e o adulto continúa nesse mesmo regime durante toda a vida. Jamais conseguimos criar uma só larva de cascudo com os pequeninos animais proprios ao plancton.

Aparelho digestivo — O aparelho digestivo está perfeitamente adaptado ao regime alimentar. A boca é mais ou menos arredondada e circunscrita pelos labios, que são revestidos de papilas, maiores e mais salientes no superior. A essa orla labial vêm ter dois curtos barbilhões. Os dentes, (fig. 3) que são espatulados, estão dispostos em quatro placas: duas superiores e duas inferiores, contendo cada uma 32 ou algumas vezes 33; sua formula dentaria é $\frac{32+32.}{32+32}$

Na parte interna da boca existe uma membrana cuja base está presa á parede anterior e que apresenta, na sua porção média, um pilar fibroso. Durante os movimentos respiratorios, essa membrana se contrái e se distende, podendo-se então verificar que ela é constituida por duas folhas que se unem proximo ao ponto de fixação. Mais do que uma simples valvula, essa membrana talvez desempenhe importante papel na respiração dessa especie, pois além de forçar a passagem da agua

pelas branquias, poderá tambem concorrer para a passagem do ar ao tubo digestivo, desde que os operculos estejam fechados.

Num exemplar de 210 mm. de comprimento e com 200 grs. de peso, o esôfago, em forma de tubo, mede 22 mm. e as suas resistentes paredes são constituidas por fibras dispostas transversalmente. O estomago, mais ou menos em forma de U, possue paredes flacidas e transparentes; está sempre cheio de ar e atinge, quando distendido, 40 mm. de comprimento. O intestino, muito longo, alcança 5 metros e 120 mm. de comprimento; apresenta as fibras musculares das paredes dispostas em zig-zag e, todo enrodilhado (dez voltas), recobre os orgãos da cavidade abdominal com excepção dos ovarios, quando desenvolvidos.

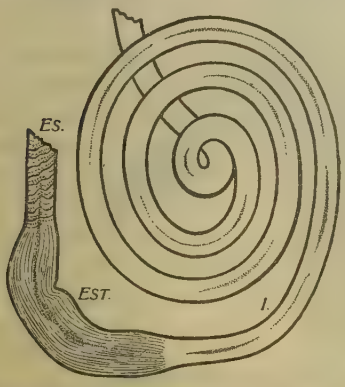


Fig. 1 — Tubo digestivo de cascudo com 15 mm. de comprimento.

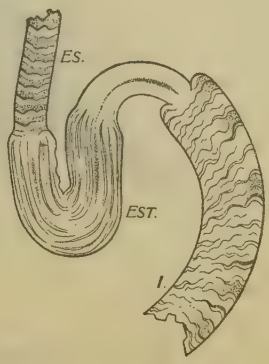


Fig. 2 — Tubo digestivo de cascudo com 22 mm. de comprimento.

Orgãos genitais — Os ovarios ocupam as porções laterais da cavidade abdominal e, quando bem desenvolvidos, comprimem os orgãos aí alojados. O numero de ovulos do cascudo não é muito grande; o peso medio dos ovarios, na época da desova e em exemplares de 242 mm. de comprimento para 418 grs. de peso, é de 42,5 grs., contendo um total de 3.000 ovulos aproximadamente. Quando maduro, o ovulo é de côr amarelo-alaranjada e hidrata-se muito pouco em contacto com a agua; sua capsula contem uma substancia que concorre para que se prendam uns aos outros, depois de fecundados; ao sair do ovario, mede 3,3 mm. e a micropila é facilmente visivel até quasi o final da evolução do ôvo.

Os testiculos do cascudo apresentam uma particularidade interessante que reside no seguinte: em geral os Nematognathas possuem testiculos franjados; entretanto os do cascudo, que em sistematica

se encontra colocado entre aqueles peixes, dão a ideia de duas fitas coladas á parede superior da cavidade abdominal (fig. 3).

Em relação aos de outras especies, desenvolvem-se pouco, mesmo durante a época da desova. Em peixes de 225 mm. de comprimento e 290 grs. de peso, não alcançam mais de 60 mm. de comprimento por 5 mm. de largura.

Fig. 3 — Testiculos de cascudo na época de desóva (desenvolvimento maximo).

A quantidade de esperma produzida pelo cascudo é muito pequena e não se pode obter pela compressão do ventre do animal. Por isso, nos trabalhos de fecundação artificial, fomos obrigados a sacrificar os machos, retirando-lhes em seguida os testiculos que por esmagamento, forneciam a pequena quantidade de esperma que continham. Ao contrario dessa pequena produção de liquido fecundante, a vitalidade do espermatozoide desse peixe é surpreendente. Conseguimos acompanhar a movimentação dos espermatozoides, em agua pura, pelo longo espaço de 70 minutos. Essa particularidade do gameta masculino e outras proprias á ecologia da especie, ás quais nos referimos mais adiante, condicionam a fecundação quasi total dos ovulos do cascudo, mesmo quando a desova se processa em natureza. O formato do espermatozoide do cascudo não difere quasi nada do que estamos habituados a observar na maioria das outras especies já estudadas, sendo apenas um pouco maior.

Respiração — Além da respiração branquial, comum a todos os peixes e sobre a qual não nos deteremos, o cascudo apresenta um orgão acessorio da respiração, que é o estomago.

Carter, depois de Jobert (1877-78), fez um minucioso estudo do canal alimentar do *Plecostomus plecostomus,* mostrando que sómente o estomago pode ser considerado como orgão acessorio da respiração. Descreve a disposição, nas paredes do estomago, da arteria e veia respiratoria (a primeira ramo da arteria coeliaca e a segunda da veia porta hepatica) e faz o estudo histologico da estrutura daquelas paredes, demonstrando que o seu epitelio interior não desempenha função digestiva, mesmo na porção terminal do orgão, onde as glandulas celulares são mais desenvolvidas. Resumindo o seu trabalho, conclui Carter por afirmar que a estrutura da parede do estomago do *Plecostomus* é muito semelhante á do *Ancistrus.* As maiores diferenças encontradas entre esses orgãos são as seguintes: ao contrario do que acontece no *Ancistrus,* o estomago do *Plecostomus* não está localizado numa porção separada da cavidade abdominal; ha nas suas paredes maior numero de glandulas celulares e a veia respiratoria deste peixe não é ramo da interrenal, como no *Acistrus* e sim um ramo da porta-hepatica. Nenhuma dessas diferenças é de grande importancia funcional. E assim Carter, pela vascularização das paredes do estomago, pelo caracter não digestivo delas, pelo habito do peixe vir á superficie da agua apanhar o ar, porque o estomago está sempre cheio de ar durante a vida do peixe e, finalmente, porque nenhum outro orgão, considerado como orgão de respiração aerea, foi encontrado no *Plecostomus plecostomus,* conclui que o estomago desta especie é um orgão respiratorio acessorio. Esse mesmo autor e Beadle fizeram documentado trabalho sobre os diferentes orgãos da respiração aerea, em varias especies de peixes, enquadrando-se em determinados grupos, segundo a localização do seu orgão acessorio da respiração. Assim, dentre as familias nacionais de agua doce, os Sternarchideos *(Hypopomus)* e Symbranchideos *(Symbranchus* (*)*)* estão colocados no grupo III: camara branquial cheia de ar; os Osteoglossideos *(Arapaima),* os Characideos *(Erythrinus)* e Lepidosirenideos *(Lepidosiren)* no grupo V: vesicula natatoria e pulmão; os Doradideos *(Doras),* os Callichthyideos *(Callichtys, Hoplosternum)* e os Loricariideos *(Ancistrus, Hypostomus* (**)*)* ocupam o grupo VI: estomago e intestino.

Esse tipo de respiração aerea, encontrado em determinados grupos, dá-lhes uma resistencia vital fóra do comum e condiciona-lhes

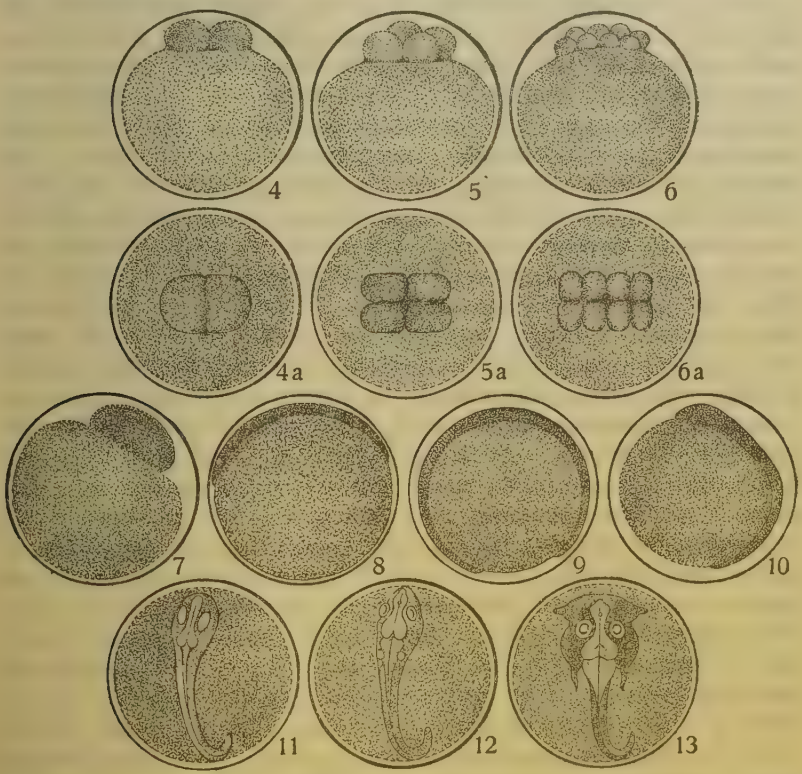
(*) O *Symbranchus marmoratus,* «mussum», pode ficar tambem no grupo IV e I: epitelio respiratorio da faringe e diverticulo faringeal.
(**) Sinonimia de *Plecostomus.*

habitos especiais. Essas especies podem viver em ambientes improprios á vida dos outros peixes e, fóra dagua, resistem á morte por um praso assaz longo. Apenas para dar uma ligeira ideia da formidavel resistencia desses peixes, citaremos algumas observações acerca da vida de duas especies muito conhecidas: o mussum, *Symbranchus marmoratus* e a piramboia, *Lepidosiren paradoxa.* Ambas passam bem em agua limpa, mas estão adaptadas á vida do charco; e ainda mais, á medida que a agua vai desaparecendo, elas vão penetrando terra a dentro em busca de humidade. O formato desses peixes e a secreção mucosa que reveste o seu corpo concorrem para que êles possam abrir verdadeiros tuneis irregulares e de grande profundidade. Em barreiros proximos de Fortaleza, onde não mais havia agua, cavamos quasi até dois metros de profundidade, sempre acompanhando esses tuneis, onde, de espaço a espaço, encontravamos exemplares de *Symbranchus marmoratus,* algumas vezes ainda vivos (em estado de hibernação), outras vezes mortos. Os vivos, retirados desses buracos e colocados em aquarios, retornam á normalidade dentro de 24 horas.

Desova natural e fecundação artificial — Entre os cascudos ha especies que costumam dedicar uma atenção toda especial aos ovos. Assim, o *Loricaria piracicabae* cola-os ao ventre, protegendo-os durante o tempo da sua evolução. Algumas especies do genero *Aspredo* tambem têm o habito de trazer os ovos colados ao peito. Em Chascomuz, Argentina, (Outubro-Novembro de 1934), tivemos ocasião de observar que o *Loricaria anus,* muito abundante nessa lagôa, costuma conduzir grandes massas de ovos, de feitio quadrangular, envolvidos quasi completamente pelo labio inferior. Verificamos tambem que um outro Loricariideo do Rio Parnaíba, Piauí, (Novembro de 1936), trazia colado ao ventre e labios, grande numero de larvas ainda com saco vetelino. E assim como essas, outras especies são apontadas como capazes de dedicar cuidados particulares á proteção da prole.

Durante a quadra da desova do *Plecostomus plecostomus* nos diferentes açudes das cercanias de Fortaleza, (Março-Abril de 1937), esforçamo-nos por observar a desova natural dele, o que, infelizmente, não nos foi possivel conseguir. Baseados, porém, nas informações de pescadores e nas que fizemos, somos levados a crer que esta especie desova nas tócas ou lócas onde habitualmente se esconde. Contou-nos um pescador que, por ocasião de uma pescaria de cascudos, topou com um dentro de uma lóca de pedra; retirado este, novamente introduziu nela a mão afim de verificar se havia mais algum, porém, em vez de cascudo, encontrou uma massa de ovos.

Nos aquarios, mesmo depois de injetados, esses peixes se mantêm em calma, nunca fazem carrousseis e dificilmente manifestam sinais evidentes de excitação. Algumas vezes pudemos surpreender machos e femeas encostados uns aos outros, mas não conseguimos nunca apanhalos desovando. Em geral 24 horas após as injeções de hipofise, apanhavamos as femeas e, por pressão no ventre, colhiamos os ovulos sobre os quais laçavamos algumas gotas de esperma, obtidas com a trituração dos testiculos. Depois de fecundados, os ovos prendem-se uns aos outros, capsula com capsula, de tal modo que se retirar um ôvo gorado, acontece, muitas vezes, que se rompe a capsula do que lhe está juxtaposto. A lenta evolução dos ovos do cascudo acarreta uma porcentagem de perda muito maior do que a que temos observado nas fecundações artificiais dos ovulos de outras especies.



Algumas fases da evolução do ôvo do cascudo. Figs. 4-6 — Divisão celular; fases iniciais vistas de perfil. Figs. 4a-6a — As mesmas fases vistas de frente. Figs. 7-12 — Formação do embrião. Fig. 13 — Embrião em fase mais adiantada.

Evolução do ôvo — O quadro da evolução do ôvo do *Plecostomus* difere, em muitos pontos, do quadro geral da evolução dos ovos da especie com que até agora temos trabalhado. Em trabalhos anteriores já demonstramos que o fator temperatura controla, por assim dizer, a evolução dos ovos dos peixes, podendo acelera-la ou retarda-la. Nas especies do Nordeste, onde a temperatura da agua é pouco variavel, tem-se observado que a evolução dos ovos se efetua dentro de 18 a 36 horas.

No *Plecostomus,* entretanto, esse limite foi demasiadamente ultrapassado, pois nesse peixe a evolução do ôvo faz-se em 7 ou 8 dias. Na fase de segmentação, as celulas provenientes da divisão do blastodisco são perfeitamente iguais e ocupam exclusivamente o polo superior do ôvo, ficando em posição bem elevada, quando vistas de perfil. A porção germinativa, constituida por essas celulas, apresenta-se com um formato quadrangular. Na fase de quatro celulas (fig. 5 a), o quadrangulo mede 1,469 mm. de comprimento. Uma dessas quatro celulas mede 0,602 mm. de largura por 0,720 mm. de comprimento. A pequena divergencia de numeros na medida das celulas e na do quadrangulo por elas formado deve decorrer da sua posição, o que dificulta um pouco a medida. Relativamente ás dos ovos de outras especies, tais celulas são grandes, podendo-se acompanhar sua divisão até a olho nú, o que em verdade é mais pratico, pois a evolução dos ovos do cascudo não se presta a ser acompanhada ao microscopio, em virtude da falta de transparencia deles. A' medida que prossegue a divisão celular, as celulas, diminuindo de tamanho, aumentam de numero e a massa germinativa, de quadrangular que era, passa a tomar a forma arredondada, apresentando os seguintes diametros, depois de 5 horas e 10 minutos de evolução: 1,420 mm. de comprimento por 1,160 mm. de largura. Decorridas 6 horas e 45 minutos, as celulas já incontaveis, formam uma massa mais ou menos redonda que, vista de perfil, se destaca nitidamente do resto do ôvo pela sua forma e pela coloração esbranquiçada, em contraste com o amarelo alaranjado da porção vegetativa (fig. 7). A' medida que o numero de celulas aumenta, a camada celular vai-se estendendo lateralmente á porção vegetativa, chegando a ficar mais ou menos no mesmo plano desta, 10 horas após a fecundação (fig. 8). Depois de 13 horas e 20 minutos de evolução, a camada atinge o equador do ôvo e com 26 horas e 20 minutos, o blastoderma está quasi a se fechar (fig. 9). Mais algumas horas, e o embrião, já esboçado, ocupa apenas $^1/_3$ da superficie do ôvo. Ao contrario do que se passa nos ovos de alguns Characideos, como o *Prochilodus argenteus,* os *Astyanax bimaculatus* e *taeniatus,* o *Curimatus elegans,* o *Hoplias malabaricus,* o *Schizodon vittatus,* etc.,

e nos de certos Nematognathas, como o *Rhamdia quelen*, o *Pimelodella lateristriga, o Trachycoristes striatulus* etc., no *Plecostomus* o embrião costuma ocupar pequena porção do ôvo. Decorridas 40 horas de evolução, surge o esboço da cabeça e da cauda, mas as protovertebras não estão nitidas; ocupa o embrião justamente a metade da superficie do ôvo (fig. 10). Dez horas mais tarde pode-se ver, na cabeça, o esboço dos olhos e das vesiculas cerebrais (fig.11). Com 55 horas de evolução, o coração do embrião bate 120 vezes por minuto. Após 64 horas, além das vesiculas auditivas, distinguem-se perfeitamente os otolitos (fig. 12); a corda dorsal vai-se acentuando, mas ainda é dificil ver as protovertebras; as vesiculas cerebrais estão então muito claras, sendo maior a segunda; o coração continúa a pulsar, mas ainda não se nota a circulação; o canal ependimario está bem visivel; a cauda vai-se desprendendo, aos poucos, do saco vitelino; na porção lateral da cabeça do embrião notam-se duas saliencias que devem ser os barbilhões. Tres dias e duas horas, a partir da fecundação, as vesiculas cerebrais estão mais fechadas, diminuindo assim a luz do canal que as atravessa. Quatro horas mais tarde pode-se observar o coração pulsando 140 a 150 vezes por minuto, mas não se nota a circulação intravitelina, ao passo que se vêm nitidamente os globulos sanguineos circular pelos vasos do corpo do embrião. Este já movimenta a cauda, que está bem separada do vitelio; na boca, mais ou menos diferenciada, notam-se os movimentos do maxilar inferior; as branquias estão visiveis, assim como o sangue que as atravessa; ao nivel da porção anterior do vitelio, notam-se duas saliencias que são o esboço das nadadeiras peitorais (fig. 13). As vesiculas auditivas contêm tres pontos negros que formam um triangulo. A micropila do ôvo, desde o inicio da fecundação até este momento, está perfeitamente nítida. A altura da cabeça do embrião é de 0,780 mm. e o comprimento de 1,380 mm.; o comprimento da cauda alcança 3,040 mm. A altura do saco vitelino é de 4,4 mm. e o comprimento vai a 4,7 mm. Com 3 dias e 15 horas, o embrião já se movimenta; a circulação (cefalica e caudal) está sendo feita, mas com pequena intensidade. A posição do embrião continúa a cavaleiro do vitelo, com a cauda dobrada lateralmente para baixo. Decorridos 4 dias e 7 horas de evolução, os movimentos do embrião, dentro da capsula, são gerais; a boca, bem formada, continúa apoiada lateralmente pelos barbilhões; as branquias estão revestidas pelos operculos, cujos movimentos são nitidos; a circulação faz-se em todos os sentidos, podendo-se acompanhar perfeitamente a travessia do sangue pelo saco vitelino. Percorrendo o vitelo ha dois vasos principais que recebem outros, que, por sua vez, já receberam outros menores; esses dois vasos se unem ao alcançar o coração. O embrião apresenta

as placas dentarias intrabucais, mas não se vêm os maxilares guarnecidos de dentes. Não obstante o seu notavel desenvolvimento, a ligação do embrião com o saco vitelino é bem pequena, ao contrario do que acontece em outras especies já conhecidas.

Duas larvas nasceram depois de cinco dias de evolução; certamente a ruptura das capsulas se deu em virtude de constantes trações que nelas fomos obrigados a fazer para limpeza dos ovos. Essas larvas apresentam-se com as nadadeiras peitorais e dorsal organizadas; comprimento da larva: 4,20 mm.; comprimento do saco: 3,270 mm. e altura dele: 3,070 mm. O exame dessas larvas, após 7 horas de vida livre, revelou a existencia do tubo digestivo, vendo-se perfeitamente o intestino e o começo da heterocerquia da cauda. As medidas da larva (comprimida entre lamina e laminula) foram as seguintes: comprimento: 6,0 mm.; altura do saco: 5,3 mm. e comprimento dele: 4,08 mm. Devemos assinalar que as larvas nascidas antes da época normal vão sofrendo as mesmas transformações que se estão processando nas que ainda se encontram protegidas pela capsula. Assim, a pigmentação dos olhos é nitida, tanto na larva que se encontra fóra da capsula como na que está dentro dela. A circulação se intensifica cada vez mais pelo constante aparecimento de novos vasos. Pode-se dizer que o saco vitelino é uma verdadeira rêde vascular, pois é percorrido por uma infinidade de pequenos vasos que correm mais ou menos paralelos e vão ter a quatro vasos maiores, de cada lado do saco; estes, por sua vez, se lançam em um unico, de cada lado do vitelo. Afóra esses dois vasos, ha mais um, tambem grande, que se ramifica varias vezes, dando essas ramificações outras tantas menores que igualmente atravessam o vitelo, paralelamente uma ás outras. Este vaso se desprende de um outro maior que acompanha a cauda da larva, mais ou menos ao nivel da dobra do réto, penetrando em seguida no saco vitelino. Ao contrario dos dois anteriores já descritos e cuja função é retirar o sangue do vitelo, este ultimo vaso conduz o sangue para aquele orgão. Assim sendo, á medida que o sangue vai penetrando no saco vitelino, conduzido por este vaso, vai saindo por intermedio dos dois anteriores, que o levam ao coração. Este orgão se compõe de duas dilatações com um estrangulamento mediano, dando a impressão de um saco amarrado ao meio. Estas observações foram feitas em larvas de seis dias de evolução depois da fecundação. Nestas mesmas larvas, as nadadeiras ventrais já estão esboçadas e o intestino começa a encurvar-se para se enrodilhar mais tarde. A heterocerquia está mais pronunciada, havendo, ao nivel da torsão da coluna, um territorio respeitado pela circulação sanguinea, e do formato de um cone arredondado. A membrana caudal não é tão vascularizada como a da traíra, notando-

se apenas regular vascularização entre a anal esboçada e o territorio a que me referi acima, que, não obstante nele não penetrarem vasos, tem os tres lados delimitados por eles.

Depois de oito dias de evolução, nasceram as larvas restantes. A posição normal dessas larvas é a inclinada: boca voltada para baixo, saco vitelino, muito grande, tocando o fundo do recipiente e servindo de ponto de apoio á larva, cuja cauda fica orientada para cima. Todas as nadadeiras já estão presentes, apenas a adiposa não está bem diferenciada. A vascularização da cauda é mais intensa ao nivel do ponto em que a coluna vertebral se desvia para cima. Nas porções que ainda restam da antiga membrana envolvente da cauda, nota-se alguma vascularização que, entretanto, se intensifica na porção que vai da anal á caudal. A larva recemnascida apresenta dentes espatulados quasi iguais aos do adulto, mas entre eles se vê ainda um ou outro de feitio aproximado de caninos. As larvas de um dia de vida livre ainda não sobem á tôna da agua; deslocam-se com certa rapidez no fundo do recipiente onde estão, sempre naquela posição já descrita (cabeça baixa, corpo apoiado sobre o vitelio e cauda levantada), movimentando rapidamente a cauda para a direita e para a esquerda afim de impelir para frente o volumoso corpo. Comprimento da larva: 8,0 mm.; altura: 3,0 mm.; comprimento do saco vitelino: 4,0 mm. e altura: 3,0 mm. (fig. 14).

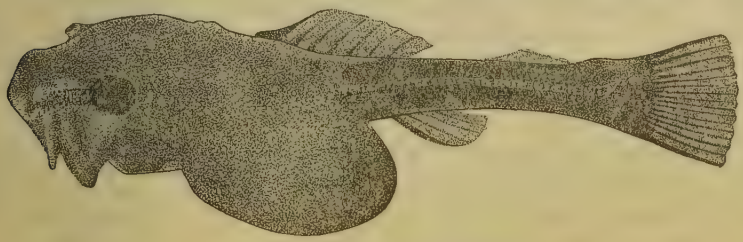


Fig. 14 — Larva recemnascida.

Na coluna dorsal dos adultos contam-se 21 vertebras livres e 4 soldadas. Ao nascer, a larva tem trinta vertebras, não estando as quatro ultimas da porção terminal da cauda, bem diferenciadas. O estudo comparativo da coluna vertebral de uma larva de dois dias de vida livre e a de um exemplar adulto, demonstra que a larva do *Plecostomus* tem maior numero de vertebras do que o adulto (30 contra 25). Talvez mais tarde algumas dessas protovertebras venham a soldar-se e daí a diminuição das vertebras no adulto. Na larva, das quatro vertebras ostariofisianas, só as duas medianas estão já concrescidas, e todas tem caracteristicos proprios (apofises tipicas); das

26 restantes, 24 apresentam apofises laterais; as duas ultimas (hipostilos) não as apresentam.

Com tres dias de vida livre, a larva mede 10 mm.; o comprimento do saco vitelino é de 3,5 mm. e a altura dele 2,5 mm.

A alimentação das larvas consiste em *Algas,* lôdo, e, ás vezes, talvez alguns *Diaptomus,* pois encontramos no tubo digestivo delas alguns espermatóforos.

Ao finalizar, quero deixar expresso o meu agradecimento a todos os companheiros que concorreram para a coléta dos dados e informes que foram utilisados na confecção deste trabalho, e, com prazer, destaco o nome do Dr. Rodolpho von Ihering e seus dignos ex-auxiliares Drs. Luiz Canale, B. Borges Vieira, A. C. Estevão de Oliveira, Waldemar C. de França e Sr. Mario Dias Maia, autor dos desenhos (copias de microfotografias) que acompanham o texto.

THE "CASCUDO" OR LORICATE FISH OF THE NORTHEASTERN RESERVOIRS

Abstract

Systematic synopsis — *The «Cascudos» are fishes very common to the internal waters of Brazil. The species which we propose to study in the present article, Plecostomus plecostomus L., belongs to the sub-family Plecostominae which is a part of the Loricariidae family. It is a near relation to the two other species: P. pusarum* Starks *and P. Carvalhoi* M. Ribeiro, *both of which exist in the Northeast.*

Habitat and fishing — *The «Cascudo» prefers to live in stony places, in the neighbourhood of cascades and waterfalls, but has adapted itself extremely well to the confined waters of the Northeast. For the fishing of the «Cascudo» one may use «tarrafas», casting, nets and even «the hand»; but to catch them by the latter process the fisherman has to dive down to their caves.*

Digestive apparatus — *The digestive apparatus is perfectly adapted to its alimentary habits. The mouth is more or less round, circumscribed by lips that are covered by papillae. Its teeth are spatulate, suitable for scraping, because this species is a slime-eater, having special preference for the algae. The esophagus presents its walls constituted by transversal fibres, the stomach, more or less in the shape of a «U», has flaccid and transparent walls, whilst in those of the intestines, which is very long, the fibres are seen disposed in a zig-zag formation.*

GENITAL APPARATUS — *The ovaries occupy the lateral portions of the abdominal cavity and at spawning time they compress the organs located therein. The average weight of the ovaries at this period and in specimens of 242 mm. in length to 418 grs. in weight, is 42,5 grs. and contains a total of approximately 3.000 eggs. The testicles of the «Cascudo» give us the impression of two ribbons glued to the upper wall of the abdominal cavity; they are small and contain a minute quantity of sperm, but the vitality of their spermatozoids is very great (70 minutes).*

RESPIRATORY APPARATUS — *Besides the gills, the «cascudo» has also an accessory organ of respiration, which is the stomach, and it can, therefore, resist many hours out of water.*

NATURAL SPAWNING AND ARTIFICIAL FECUNDATION — *Contrary to the other species of «Cascudos» that dedicate special care to their eggs, protecting them during their evolution, for which purpose they are in the habit of carrying them attached to their bellies or lips (Loricaria piracicabae, Loricaria anus), this species spawns in holes or stone caves. Immediately after fecundation the eggs attach themselves one to the other, capsule to capsule, in such a way that on detaching an addled egg it often happens that one breaks the capsule of the egg juxtaposited. The slow evolution of the eggs (7 to 8 days) entails, is artificial fecundations, a percentage of loss much greater than that which we have observed in other fishes.*

EVOLUTION OF THE LARVA — *The larva of the «Cascudo» presents at birth all the fins, the adipose being a little differentiated. The normal position of these larvae is inclined: mouth turned downward, vitelline bag very large, touching the botton of the tanks and serving as a point of support for the larva, the tail of which is guided upward. They show spatulate teeth almost similar to those of the adult; but among these are still seen one more with a shape like the canines. Its alimentation from this time on is restricted to algae, principally the Diatomacea; the Naviculacea and Flagellaria types predominating.*

BIBLIOGRAFIA

AZEVEDO, P. DE — 1938 — Da biologia dos peixes nordestinos (Fragmento biocenotico). *Livro Jubilar Prof. L. Travassos,* Rio de Janeiro, 51-60.

AZEVEDO, P. DE e L. CANALE — 1938 — A hipofise e sua ação nas gonadas dos peixes neotropicos. *Arch. Inst. Biol.,* S. Paulo, 9, 165-186.

CARTER, G. S. and L. C. BEADLE— 1931 — Reports of an expedition to Brazil and Paraguay in 1926. — 7. *Linnean Society's Journal* — Zoology, 37.

CARTER, G. S. — 1935 — Reports of the Cambridge expedition to British Guiana, 1933. *Linnean Society's Journal — Zoology,* 39, n.º 265.

Devincenzi, G. J. — 1933 — La perpetuacion de la especie en los peces sudamericanos. *Imprenta Nacional,* Montevideo.

Ihering, R. v. — 1929 — Da vida dos peixes. *Companhia Melhoramentos,* S. Paulo.

Ihering, R. v. — 1930 — Notas ecologicas referentes a peixes d'agua doce do Estado de S. Paulo e descripção de quatro especies novas. *Arch. Inst. Biol.,* S. Paulo, **3,** 93-104.

Ihering, R. v. e P. de Azevedo, — 1935 — Experiencias com o esperma da curimatã (Prochilodus) dos açudes salgados da Paraíba. *Anais da Acad. Bras. de Sc.,* Rio de Janeiro, **8,** n.º **1.**

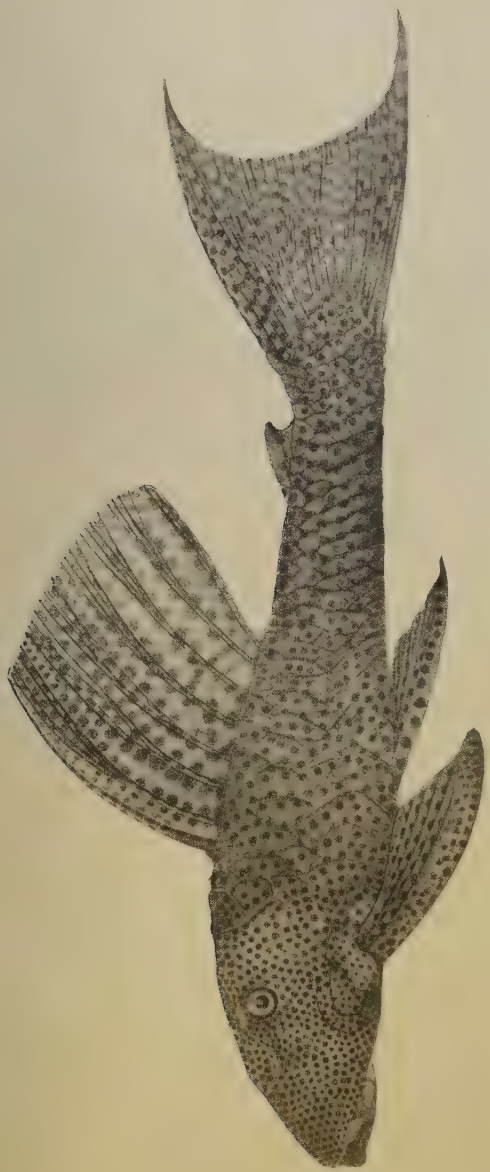
Ihering, R. v. e P. de Azevedo — 1936 — A desova e a hypophysação dos peixes. Evolução de dois Nematognathas. *Arch. Inst. Biol.,* S. Paulo, **7,** 107-118.

Ihering, R. v. — 1938 — Em pról da catalogação da fauna do Brasil. *Livro Jubilar Prof. L. Travassos,* Rio de Janeiro, 221-229.

Miranda-Ribeiro, A. de — 1911 — Fauna Brasiliense, Peixes, 4 (A). *Arch. Mus. Nac.,* Rio de Janeiro, **16,** 47-48.

Miranda-Ribeiro, A. de — 1937 — Sobre uma coleção de vertebrados do Nordeste do Brasil. *O Campo,* Rio de Janeiro, **85,** 54-56.

Starks, E. C. — 1913 — The fishes of the Stanford Expedition to Brazil, *Stanford Univ. Publ.,* Univ. Ser., **31.**



CASCUDO
Plecostomus plecostomus L.

Vol. 9 — Art. 21 Dezembro de 1938

SOBRE O FENOMENO DA "PROMUNIDADE" E SUA SIGNIFICAÇÃO.

I - INESPECIFICIDADE E NATUREZA LOCAL DO FENOMENO

POR

O. Bier

Do Instituto Biologico de S. Paulo

Sob a designação de «Promunidade», descreveram, em 1936, Oerskow & Kauffmann (2), um curioso fenomeno observado no decurso de pesquisas sobre a imunidade contra o tifo, no camondongo: Si se injetam no peritonio de camondongos, suspensões aquecidas $1\,^1/_2$ horas a 60º de *B. typhosus* H 901, variante V ou variante W, representando 100 milhões de bacterias, e si, dois dias depois, se injetam os animais, tambem por via peritonial, com uma dóse seguramente mortal da variante V, observa-se a sobrevivencia tanto dos camondongos inoculados com a vacina V, como dos protegidos pela vacina W. Si porém, a injeção de prova fôr feita 2 semanas após a vacinação, como é sabido, sobrevivem apenas os camondongos protegidos pela vacina V, ao passo que os inoculados com a vacina W morrem ao mesmo tempo que os controles.

Daí concluiram Oerskow & Kauffmann que se devem distinguir duas especies diferentes de imunidade:

1. A Imunidade classica, que aparece tardiamente, e que no tifo só se obtém por meio das vacinas contendo o antigeno «Vi».

2. A Promunidade, que se desenvolve rapidamente, porém tambem logo desaparece, e que se obtém tanto com as formas V, como com as W, do bacilo tifico.

Assim, pois, no decurso da imunisação intraperitonial do camondongo pelo B. tifico, ao invês de se desenvolver, a principio, um estado de hiperreceptividade ou fase negativa, precedendo o aparecimento da imunidade especifica, o que aparece é um estadio precoce de resistencia aumentada: a promunidade.

Oerskow & Kauffmann aproximam a promunidade do fenomeno descrito em 1920 por Morgenroth, Biberstein & Schnitzer (1) em camondongos injetados com um estreptococo enverdecente avirulento, e superinfectados, 2-3 dias após, com estreptococos hemoliticos virulentos: nestas condições, a morte dos animais é retardada em relação á dos controles e tudo se passa como si a primeira injeção de germes virulentos deprimisse a virulencia dos estreptococos de superinfeção *(Depressionsimmunität)*.

No presente trabalho são referidos alguns fatos de interesse para a interpretação e a avaliação da importancia do fenomeno da promunidade, tendo-se particularmente em vista o esclarecimento dos dois pontos seguintes:

1) Inespecificidade da promunidade.
2) Natureza local do fenomeno.

1 — Inespecificidade do fenomeno da promunidade.

Em discordancia com as conclusões de Oerskow & Kauffmann, que atribúe certa especificidade de grupo ao fenomeno da promunidade, resulta de nossas experiencias sintetisadas nas tabelas 1, 2 e 3, uma ausencia absoluta de especificidade.

TABELA 1

Fenomeno de «promunidade» após vacinação prévia com suspensões bacterianas diversas (500 milhões de germes mortos a 60º 1 hora) seguida 24 horas depois de infecção pela mesma via (intraperitonial) com 500 milhões de *B. typhosus* Ty 2 «Vi».

Resultado após	Controles	S. london	S. para A	S. para B	S. sendai	S. münchen	S. breslau	S. enteritidis	B. coli	Estafilococo «H»	Pasteurella bubalisep-tica
24 hs.	4/4	0/4	0/3	0/4	0/4	0/4	0/3	0/4	1/3	1/3	0/3
48 hs.	4/4	0/4	0/3	0/4	0/4	0/4	0/3	0/4	1/3	1/3	0/3
120 hs.	4/4	0/4	0/3	0/4	0/4	1/4	2/3	1/4	1/3	1/3	0/3

Esclarecimento: 4/4: De 4 camondongos injetados, morrem 4. 0/4: De 4 camondongos injetados nenhum morre.

As experiencias reunidas nas tabelas 1, 2 e 3 claramente indicam a falta absoluta de especificidade do fenomeno da promunidade.

1. Não sómente varios tipos de salmonelas, em confirmação dos trabalhos de Oerskow & Kauffmann, mas tambem germes completamente não relacionados sôrologicamente com o *B. typhosus,* como o estafilococo e a *Pasteurella bubaliseptica* são capazes de condicionar o fenomeno de promunidade contra o *B. typhosus* (tab. 1).

2. A mesma falta de especificidade se evidencia nas experiencias condensadas na tabela 2: A uma série de lotes de tres camondongos injetam-se emulsões de germes mortos em diluições 10 vezes mais fortes que as usadas na experiencia anterior, isto é, representando apenas 50 milhões de bacterias: 4 diferentes raças de *B. typhosus*

(901 «H»; Ty2 «Vi»; «*Rawlings*» e «*Rawlings rejuvenated*») e 1 raça de *S. london*. Tres animais controles recebem o mesmo volume de agua fisiologica em injeção intraperitonial.

TABELA 2

Fenomeno de promunidade após vacinação prévia com varias amostras de *B. typhosus* (50 milhões de germes mortos a 60º 1 hora) seguida, 24 hs. depois, de infeção pela mesma via (intraperitonial), com 50 milhões de *B. typhosus* Ty2 "Vi" (dose sub-letal).

	Agua fisiologica	S. london	Typhus 901 "H"	Typhus Ty2 "Vi"	Typhus Rawlings Spm 270 b	Typhus Rawlings rej.
24hs	1/3	0/3	2/3	1/3	1/3	1/3
48hs	1/3	0/3	2/3	1/3	1/3	1/3
120hs	1/3	0/3	2/3	1/3	1/3	1/3

Após 24 horas, são todos os animais infectados pela mesma via com 50 milhões de *B. typhosus* Ty2 «Vi».

Resultado: uma proteção nitida e absoluta só se obteve, nestas condições de tecnica, por meio da amostra *London*. As amostras de bacilo tifico (inclusive a amostra homologa Ty2 «Vi») não conferiram

TABELA 3

Fenomeno de "promunidade" após vacinação prévia com *S. london* (500 milhões de germes mortos a 60º 1 hora), seguida, 24 hs. depois, de infeção pela mesma via (intraperitonial) de *B. typhosus* Ty2 "Vi" ou de gonococo.

		Tratamento prévio do peritonio com	
		S. london (500 milhões)	Agua fisiologica (controles)
Germe infectante	*B. typhosus* Ty2 "Vi" (500 milhões)	0/4	4/4
	Gonococo - mucina (1 bilhão)	0/4	4/4

proteção maior do que a assegurada pela simples irritação do peritonio produzida pela agua fisiologica, havendo mesmo uma amostra (*Typhus* 901 «H»), que conferiu ainda proteção menor.

3. Outra contraprova da inespecificidade do fenomeno é dada na tab. 3: a vacina *London* protege em 24 hs. tanto contra o *B. typhosus*, quanto contra o gonococo *(mucin-test)*. Nesta mesma tabela póde-se vêr que, trabalhando com dóses adequadas de emulsão vacinante

(500 milhões de *S. london)* e de emulsão infectante (500 milhões de Ty2 «Vi»), facilmente se evidencia o poder vacinante inespecifico das suspensões bacterianas em relação ao leve gráo de proteção conferido pela simples injeção prévia de agua fisiologica.

A' mesma ausencia de especificidade se refere igualmente REITER (3) o qual obteve no camondongo uma imunidade de depressão contra o estafilococo, quer com o estafilococo, quer com o pneumococo; por outro lado verificou REITER que a imunidade de depressão contra o pneumococo não póde ser obtida por meio de 3 injeções intraperitoniais intervaladas de 7 dias do germe homologo, porém se consegue, embóra em gráo fraco, nas mesmas condições de tecnica, mediante a injeção de estafilococos.

Tanto a «imunidade de depressão», quanto a «promunidade» são, pois, fenomenos inespecificos de aumento de resistencia, que se desenvolvem rapidamente após a injeção do antigeno e desaparecem tambem pouco tempo depois.

TABELA 4

Tempo de desenvolvimento da «promunidade»

Camondongos inoculados por via i. p. com 500 milhões de *S. london* e injetados 24 hs. após com 500 milhões de *B. typhosus* Ty2 «Vi».

Intervalo entre a vacinação e a infecção; horas	0	2	4	6	12	24	2 x 24	4 x 24	6 x 24
Resultado após 24 horas	3/3	3/3	2/3	1/3	0/3	0/3	0/3	0/3	3/4

Efetivamente, a verificação do tempo requerido para o aparecimento e regressão do estado de promunidade (tab. 4) mostra que o estado de resistencia do peritonio se esboça em cerca de 4-6 hs. após a injeção da suspensão bacteriana, atinge completo desenvolvimento após 12 horas, e mantém-se durante 96 hs., começando a regredir

TABELA 5

Tempo de desenvolvimento da «imunidade de depressão», segundo MORGENROTH & al.

Intervalo entre a 1.ª e 2.ª infecção . . .	0	6	24	2 x 24	3 x 24	5 x 24	6 x 24
Resultado após 3 dias.	10/10	5/10	1/10	0/10	0/10	0/10	Regressão da resistencia (*)

(*) Não se encontram dados exatos no trabalho citado de MORGENROTH & al., mas o prazo de 6 dias é referido como aquele em que se inicia a regressão do estado de resistencia conferido pela 1 ª injeção: *«am 6. Tage nach der Erstinfektion ein grösserer Teil der Tiere für akute Nachinfektion voll empfänglich, und am 7. Tage überlebt kaum eines der vorbehandelten Tiere».*

sómente 6 dias depois. Os resultados consignados na tab. 4., estão de acôrdo com os obtidos por MORGENROTH, BIBERSTEIN & SCHNITZER (1) no estudo da «imunidade de depressão» do camondongo contra o estreptococo (tab. 5).

E' legitima, pois, a aproximação feita por OERSKOW & KAUFFMANN entre o fenomeno da «promunidade» e a chamada «imunidade de depressão». Um carater, entretanto, parece á primeira vista, separar os dois fenomenos: segundo MORGENROTH, BIBERSTEIN & SCHNITZER (1), a «imunidade de depressão» se obtém tanto no caso em que ambas, a 1.ª e a 2.ª injeções, se fazem por via intraperitonial, quanto no caso em que a 1.ª injeção é feita por via subcutanea e a 2.ª por via intraperitonial.

Em contradição com esse fato, referem OERSKOW & KAUFFMANN que, em suas experiencias, quando a vacina era dada por via subcutanea, a proteção conferida era nitidamente menor do que quando ambas, a vacinação e a infeção, se faziam por via intraperitonial. Investigações complementares sobre esse ponto eram, pois, necessarias.

2 — Natureza local do fenomeno.

A tabela 6., mostra a ausencia absoluta de proteção quando a vacina e a injeção infectante não são feitas pela mesma via.

TABELA 6

Ausencia de proteção quando a vacina é injetada por via subcutanea.

Vacinas	Resultado observado após 24 hs., segundo a via usada para a vacinação	
	1) Subcutanea	2) Intraperitonial
London .	4/4	1/4
München.	4/4	0/4
Jena . .	4/4	1/4

Em algumas experiencias pudemos verificar certo retardamento da morte dos animais vacinados por via subcutanea em relação aos controles não tratados, porém a diferença observada, nas condições experimentaes em que trabalhámos, não foi bastante nitida para que se possa afirmar o estabelecimento de uma proteção definida pela via subcutanea, visto que pequenas oscilações se pódem observar tambem no tempo de morte dos controles, de acôrdo com a susceptibilidade individual dos camondongos.

De nossas proprias experiencias podemos apenas concluir que o fenomeno de «promunidade» é essencialmente um aumento de resistencia local e que si uma resistencia geral tambem se estabelece, é de muito pequeno gráo.

Que significação tem esse fato na interpretação do fenomeno da «promunidade», em particular nas suas relações com a chamada «imunidade de depressão»? Deste ponto de vista, póde-se estabelecer entre os dois fenomenos, promunidade e imunidade de depressão, o mesmo paralelo que entre os fenomenos de SANARELLI e de SHWARTZMAN, os quais, segundo as pesquisas de P. BORDET (1931) e as de GRATIA & LINZ (1932), são essencialmente identicos.

SANARELLI (4) injeta na veia de coelhos uma dóse sub-letal de vibriões colericos seguida, 24 horas após, de uma 2.ª injeção venosa de colitoxina. Nessas condições, desenvolvem-se lesões hemorragicas no intestino delgado, no mesenterio, nos rins, e uma grande porcentagem de coelhos morre, com hipotermia e convulsões. A interpretação dada por SANARELLI a essa experiencia é que os vibriões colericos, graças ao seu enterotropismo, localizam-se no intestino (foi sempre possivel isolar o vibrião da parêde intestinal dos animais injetados) criando aí um fóco de sensibilização para a ação desencadeante do antigeno colibacilar.

Entretanto, segundo SANARELLI, as injeções intravenosas de vibriões mortos não são aptas a sensibilizar o intestino á colitoxina. Da mesma maneira, APITZ e GERBER, estudando o chamado «fenomeno de Shwartzman geral», nunca puderam observar o quadro caracteristico da experiencia de SANARELLI, nomeadamente as hemorragias da parêde intestinal.

Segundo SHWARTZMAN (5) ha entre o fenomeno por ele descrito com os filtrados de culturas bacterianas (exotoxina de Shwartzman) e a observação de SANARELLI, uma diferença resultante do fato que, no ultimo caso, em adição aos fatores bacterianos soluveis, operam tambem os microorganismos vivos usados para á injeção preparante. O efeito combinado destes dois fatores é que condiciona o quadro caracteristico da experiencia de SANARELLI.

Particular referencia merece o fato que os microorganismos vivos, graças ao seu organotropismo, poderão criar fócos de sensibilização local, mesmo quando injetados por via venosa (como no caso dos vibriões colericos, que se localizam electivamente na parêde do intestino).

Pensamos que identicas considerações pódem ser feitas a proposito da promunidade e da imunidade de depressão e

que a maior repercussão geral, no ultimo caso, deva ser igualmente atribuida ao efeito combinado de fatores bacterianos soluveis com a ação do germe vivo.

RESUMO

1. As observações de Oerskow & Kauffmann relativas á promunidade do camondongo contra o *B. typhosus* «Vi» são confirmadas e ampliadas.

2. A inespecificidade do fenomeno e o seu tempo de desenvolvimento aproximam-no da condição descrita por Morgenroth e col. sob o nome de imunidade de depressão.

3. A natureza quasi puramente local da «promunidade», em contraste com a resistencia geral que se desenvolve na «imunidade de depressão» pódem ser explicadas, em analogia com os fenomenos de Sanarelli e de Shwartzman, pelo efeito combinado do germe vivo e de fatores bacterianos soluveis.

ÜBER DAS PROMMUNITÄTS-PHÄNOMEN UND SEINE BEDEUTUNG.

I. MITT. - UNSPEZIFITÄT UND LOKALE NATUR DES PHÄNOMENS.

Zusammenfassung

Die Feststellungen Oerskow's *und* Kauffmann's, *dass die intraperitoniale Einführung abgetöteter Salmonellenaufschwemmungen den Mäusen eine merkbare Resistenz gegenüber der intraperitonialen Einspritzung virulenter Typhusbazillen (Vi) verleiht, sind bestätigt und erweitert worden.*

Diese Resistenz wurde nur beobachtet, wenn beide Einspritzungen in die Bauchhöhle verabfolgt wurden. Im Gegensatz zu den Versuchsergebnissen Oerskow's *und* Kauffmann's *erwies sich diese Typhusresistenz als vollkommen unspezifisch, die sowohl durch Salmonellen als auch durch andere Bakteriengattungen verursacht werden kann. Ausserdem wurde beobachtet, dass die Impfung mit Salmonellen imstande ist, auch gegen virulente Gonokokken zu schützen.*

Diesselbe Zeitspanne, die von Morgenroth *und* Mit. *für die Depressionsimmunität beschrieben wurde, wird auch für die Prommunität festgestellt, d. h., sie wird in 6 Stunden nachweisbar, ist in 12 Std. vollkommen entwickelt und klingt erst nach 96 Std. ab.*

Die hier mitgeteilten Versuchsergebnisse berechtigen, an einen Parallelismus zwischen dem Shwartzmanschen Phänomen und der Prommunität einerseits, und dem Sanarellischen Phänomen und der Depressionsimmunität anderseits zu denken.

Die allgemeine grössere Auswirkung des Sanarelli-Phänomens und der Depressionsimmunität, im Gegensatz zu den fast nur lokalen

Erscheinungen des Shwartzmanschen Phänomens und der Prommunität, dürfte einem Sammel-Effekt von löslichen Bakterienfaktoren und der Wirkung des lebenden Keimes zugeschrieben werden.

BIBLIOGRAFIA

1 — Morgenroth, J., Biberstein, H. & Schnitzer, R. — 1920 — Die Depressionsimmunität. *Deut. Med. Woch.*, **1**, 337-340.

2 — Oerskow, J. & Kauffmann, F. — 1936 — Untersuchungen über die Typhusimmunität der Maus. *Zeitschr. f. Hyg.*, **119**, 65-71.

3 — Reiter, H. — 1936 — Studien über das Infektionsproblem, I. Mit.. *Zeitschr. f. Immunitätsf.*, **46**, 173-182.

4 — Sanarelli, G. — 1924 — De la pathogénie du choléra. Le choléra experimental. *An. Inst. Past.*, **38**, 11-71.

5 — Shwartzman, G. — 1927 — *Phenomenon of Local Tissue Reactivity*. Cf. pp. 211-212. Hoeber Inc., New York.

———o———

Vol. 9 — Art. 22 Dezembro de 1938

SOBRE A AUSENCIA DO VIRUS DA DOENÇA DE AUJESZKY NO CEREBRO DOS ANIMAIS

POR

V. Carneiro

Do Instituto Biologico de S. Paulo

No curso dos primeiros ensaios com o virus da doença de Aujeszky, quando recebemos um primeiro material, constituido de fragmentos de cerebro de um bovino que sucumbira á doença, o que permitiu o isolamento do virus, impressionados com a facilidade e a segurança com que se realisa a infecção por via subcutanea ou intramuscular, tentamos algumas vezes a recuperação do virus dos coelhos assim inoculados na face interna da coxa, retirando apenas o cerebro dos animais que sucumbiam á infecção. Bem depressa, no entanto, foi facil verificar que não decorriam normalmente as passagens com cerebro dos animais assim inoculados. Nem sempre os coelhos morriam dentro do praso habitual, havendo um periodo de incubação mais longo. Outras vezes falhavam as passagens.

A principio podia-se pensar na destruição do virus no cerebro dos animais, ou numa diminuição de sua virulencia. Essa impressão era falsa, pois o virus da doença de Aujeszky não sofre, por passagens no coelho, nenhuma diminuição de virulencia e é bem resistente, de facil conservação por passagens em série de cerebro a cerebro, no coelho, por via subdural; é tão constante e seguro o resultado dessas inoculações, que de regra não injetamos hoje senão um unico animal com uma determinada amostra, para conservação dos virus isolados. Trata-se de um virus resistente mesmo aos processos comuns de destruição dados por autopsias tardias, ou pela remessa de material de grandes distancias, fóra do gelo. Ele pode ser isolado de cerebros remetidos inteiros, de longe, com longo periodo á temperatura ambiente, condição de trabalho impropria, mas que ainda se realisa quando o proprio leigo se encarrega de remeter material para exame.

Procuramos mais tarde esclarecer o que se passava, e alguns dados reunidos parecem-nos assaz interessantes, pelo que os vamos relatar. São concernentes á ausencia do virus no cerebro dos animais na infecção natural e na experimental. Discutiremos em seguida os resultados que encontram já agora, na literatura, exemplos identicos, embora nem sempre a tais resultados se tenha dado a importancia que de fato têm, como tentaremos mostrar. Analisaremos igualmente a interpretação que se deve dar á ocorrencia desses fatos, para os quais

somos os primeiros a chamar a atenção de modo especial, discutindo-os com o objetivo de dar-lhes explicação.

Os nossos resultados foram obtidos não só no coelho, que, como se sabe desde Aujeszky, constitue o animal de eleição, para isolamento e estudo de virus, como nos bovinos e no cão.

Nem sempre, como se verá, se pode falar de uma ausencia total do virus no cerebro, havendo ás vezes pequena quantidade de virus, só verificavel por inoculação de doses muito altas de material. Mas temos alguns casos bem caracteristicos em que o virus não pôde ser isolado do cerebro, mesmo lançando mão de altas doses de material nervoso. De qualquer modo, ausencia total de virus no cerebro em certos casos, presença de virus em pequena quantidade, em outros, são fatos de ocorrencia mais ou menos frequente. Além disso, nos trabalhos comuns de rotina de diagnostico, ou de passagens de controle, ausencia total de virus, ou presença do mesmo em pequena quantidade, têm praticamente a mesma significação, porque nas condições habituais de inoculações, com doses normais de material, o resultado é sempre dado como negativo. Só prevenido pelas verificações nesse sentido é possivel escapar a essa causa de erro. Daí decorre o interesse dos fatos que vamos relatar e discutir. Eles têm importancia nos estudos de laboratorio, sobre a doença, e na colheita de material para diagnostico. Além disso explicam os casos de insucesso no isolamento do virus da infecção natural, quando no entanto a doença evoluiu de modo tipico; e na literatura é facil encontrar alguns exemplos em que essa causa de erro certamente, explica os insucessos das tentativas nesse sentido.

A exposição das observações que tivemos oportunidade de reunir é seguida de uma analise dos dados que se encontram na literatura, sobre o assunto, principalmente nos trabalhos de Remlinger e Bailly, nos de Hurst, e de uma interpretação desses fatos.

O cerebro deixa de ser, portanto, no caso da doença de Aujeszky, o unico material de escolha para o isolamento do virus na infecção natural e recuperação do virus na infecção experimental, quando realisada por via subcutanea, intramuscular, intratesticular, etc.

Mas a questão da ausencia do virus no cerebro tem um interesse diverso e maior, quando examinada sob outros aspetos: 1 — ela reclama uma analise que forneça explicação para a patogenia da infecção nesses casos em que o cerebro não foi alcançado pelo agente infeccioso; 2 — a ausencia de virus no cerebro e em certos organs, contrastando com a sua presença na medula e em organs de rica iner-

vação nos bovinos, sugerem um comportamento neurotropico do virus nessa especie. Como se vê, o assunto comporta um interesse mais amplo do que o que residiria apenas na rotina de colheita de material.

As primeiras verificações mais completas nesse sentido, além de outras ocorridas em trabalhos de rotina, foram obtidas em bovinos e na infecção experimental. Eram animais inoculados com outro objetivo e pretendiamos estudar o quadro da doença nessa especie, a curva termica e sobretudo a virulencia do sangue e dos organs.

1.ª Experiencia. Bezerro n.º 2. Infecção experimental. Inoculado por via subcutanea na região situada atraz da espadua, com 10 cc. de uma emulsão espessa de cerebro de um bovino que havia sucumbido á infecção natural. O material de inoculação foi verificado virulento por inoculação previa no coelho.

Bezerro n.º 2. Data de inoculação: 22-1-35, á tarde.

Primeiros sintomas: 29-1-35, pela manhã.

Periodo de incubação de 6 1/2 dias, portanto. Prurido no ponto de inoculação. Morte: 30-1-35, ás 12 horas. Duração de 30 horas.

Material retirado: cerebro, baço, figado, rins, urina, saliva, sangue durante o periodo febril. Os resultados estão resumidos na tabela 1.

TABELA 1

Pesquisa de virus da doença de Aujeszky em material do bezerro 2
Inoculações: dia 30-1-935

Material inoculado	Dose	Via	Coelhos	Resultado
Saliva em periodo frebril . .	1 cc.	Subcutanea	9192	—
» » » » . .	0.25 cc.	Camara de olho	9193	—
Urina	2 cc.	Intramuscular	9206	—
Baço, figado e rins	4 cc.	Subcutanea	9207	—
Sangue em periodo febril. .	20 cc.	»	9208	—
» » » » . .	5 cc.	»	9209	—
Cerebro, emulsão ao decimo	0.2 cc.	Subdural	9233	—

Os animais inoculados por via subcutanea foram observados durante 21-23 dias e os inoculados no cerebro e camara de olho, durante 15 dias.

Como se vê, o virus não existia em quantidade verificavel, pelo menos nas condições experimentadas, nem nos organs, baço, figado e rins, nem no cerebro, nem no sangue ou na saliva, colhendo-se sangue e saliva durante o periodo febril de 41º, cerca de 8 horas depois do inicio dos sintomas. Os resultados adiante relatados darão, ao que nos parece, uma explicação dessa série de resultados negativos que não teriam significação alguma si não fosse possivel esclarece-los pelas expe-

riencias que se seguem. Si a medula espinal tivesse sido retirada, estamos certos de que o virus teria sido recuperado.

E' curioso assinalar desde já que o sangue do bezerro n.º 2 inoculado no coelho em doses de 5 e 20 cc. não revelou presença do virus e que a virulencia do sangue não deve ser assim um dado tão constante como o fazem supor resultados obtidos no coelho.

2.ª Experiencia. Bezerro n.º 4. Infecção experimental. Recebe por via subcutanea, na região atraz da espadua, do lado direito, 10 cc. de uma emulsão ao decimo, de cerebro de coelho. Data de inoculação: 24-4-935. Primeiros sintomas: 29-4-35. Periodo de incubação de 4 1/2 dias. Morte: 30-4-35 ás 9 hs. da manhã. Duração de cerca de 30 horas, portanto. Os resultados estão na tabela 2.

TABELA 2

Virulencia de organs e secreções

Material inoculado	Dose cc.	Via	Coelhos	Data de inoculação	Data de doença	Prurido	Resultado
Cerebro	1	Intramuscular	9505	6-5-35			—
Medula cervical . . .	1	»	9506	»	10-5-35	+	+
Medula dorsal. . . .	1	»	9507	»	9-5-35	+	+
Medula lombar . . .	1	»	9508	»	10-5-35	—	+
Ciatico	1.5	»	9509	»			—
Pulmão	1.5	»	9510	»			—
Glandulas salivais . .	1.5	»	9511	»			—
Diafragma	2	»	9512	»	10-11-5-35	+	+
Capsulas suprarenais .	1.5	»	9513	»			—
Liquido do edema local	2.5	»	9514	»			—

O coelho n.º 9.505, inoculado com emulsão de cerebro, veiu a morrer acidentalmente ao cabo de 30 dias de observação. Repetimos então a inoculação com material de cerebro do bovino n.º 4, na dose de 5 cc. por via subcutanea, no coelho 9 652. Este morre ao cabo de 9 dias, sem sintoma de prurido local. Passagem de uma emulsão de medula e cerebro deste ultimo ao coelho 9.713 dá um resultado positivo com extensa zona dilacerada no ponto de inoculação.

Como se vê, a presença do virus no cerebro, depois de um primeiro resultado negativo com uma dose elevada, só pôde ser verificada aqui pelo emprego de uma alta dose de 5 cc. de emulsão espessa de substancia nervosa, dose que em geral nunca se utilisa em ensaios desta natureza, e assim mesmo dando um periodo de incubação de 9 dias. A medula espinal era no entanto virulenta em toda sua extensão e o virus daí facilmente isolavel com periodo habitual de incubação e prurido tipico, o que facilita o diagnostico sem necessidade de recorrer a passagens.

A virulencia do diafragma não decorre aqui da visinhança de organs virulentos como o pulmão, nem do sangue, pois o organ foi cuidadosamente lavado antes de ser realisada a inoculação. E' curioso constatar que o exsudato abundante que se forma na zona que é séde do prurido se mostrou avirulento na dose de 2.5 cc., o que é ainda discordante do que os livros registram como um dado constante.

Convem observar que a infecção foi feita, neste caso, por inoculação na espadua e não na face interna da coxa. A séde da inoculação deve explicar a virulencia do diafragma e a ausencia de virus no ciatico. Pelo menos o confronto dos resultados deste caso n.º 2 com os resultados do 3.º caso, que se segue logo adiante, permite essa conclusão, pois vamos ver no caso seguinte, por inoculação na face interna da coxa, um resultado inverso, traduzido pela virulencia do ciatico e ausencia de virus no diafragma.

3.ª Experiencia. Bezerro n.º 5. Infecção experimental. Um mestiço zebú recebe por via subcutanea 10 cc. de uma emulsão ao decimo, de virus de cerebro de coelhos, na face interna da coxa direita, zona que se aproxima da séde habitual do prurido na infecção natural.

Data de inoculação: 10-10-35, ás 15 hs. 30.
Primeiros sintomas: 17-10-35, pela manhã. Incubação: 6 dias e 16 horas.
Morte: durante a noite de 17-18-10. Duração entre 12-18 horas.
Autopsia ás 11 hs. de 18-10.
Pesquisa de virulencia de organs e secreções. (Tab. 3).

TABELA 3

Virulencia de organs e secreções do bezerro 5

Material inoculado	Dose cc.	Via	Coelhos	Data da inoculação	Data de doença	Prurido	Resultado
Extrato de testiculo .	8	Subcutanea	10331	19-10-35			—
» » musculo .	2.5	»	10332	21-10-35			?
Cerebro	5	»	10333	»			—
Medula cervical . . .	3	»	10334	»	25-10-35	+	+
Suprarenais.	1	»	10357	23-10-35	27-10-35	+	+
Diafragma	2	»	10358	»			—
Liquido do edema . .	2	»	10359	»			—
Coração.	2	»	10360	»			—
Musculo.	2	»	10361	»			?
Ciatico (oposto ao lado da inoculação) . .	2	»	10362	»	27-10-35	+	+
Baço	2	»	10363	»			—
Fígado	2	»	10364	»			—
Rim	2	»	10365	»			—
Pulmão	2	»	10366	»			?

Os animais inoculados foram observados até 7-12-35, portanto durante um periodo de 45 dias; apenas o numero 10358 o foi durante 19 dias.

Verificam-se aqui alguns resultados dignos de nota:

I — Em primeiro logar, a ausencia de virus no cerebro, mesmo usando uma dose de 5 cc. de uma emulsão espessa, tendo sido a observação do animal inoculado prolongada até um mês e meio. Verificou-se a virulencia da medula cervical a uma dose menor, de material inoculado, 3 cc., tendo o animal inoculado reagido dentro do periodo habitual de 4 dias, por via subcutanea e revelado o prurido caracteristico. A medula das regiões posteriores não foi inoculada e parece claro que com maiores razões o resultado seria positivo; seria inoculada apenas no caso em que falhasse a inoculação da medula cervical.

Não se poderia objetar que a ausencia de resultado positivo para o cerebro decorre aqui da ausencia de virus em certas zonas, assunto bem estudado na doença de Aujeszky por REMLINGER e BAILLY (10-11), em recente trabalho, como veremos mais longe. Esta interpretação não parece caber ao nosso caso porque o material de cerebro de bovino que serviu ás inoculações foi colhido em regiões as mais diversas do cerebro e de modo abundante, para evitar justamente uma causa de erro nesse sentido. Porque um fenomeno identico foi estudado na raiva (5-7), e prevenia-nos nesse sentido. Além disso, tendo sido a autopsia realisada no dia 18, pouco depois da morte, o material foi conservado em grandes frascos, no gelo a + 5° C., durante 3 dias, o que facilita a difusão do virus pela substancia nervosa e pelo liquido conservador, que era glicerina fosfatada.

II — Deve-se notar, em segundo logar, a virulencia do ciatico retirado do lado oposto ao em que fôra feita a inoculação. Do mesmo modo merece referencia a virulencia das capsulas suprarenais que, como se sabe, possuem uma rede nervosa muito rica. Deve-se ainda ressaltar a ausencia do virus no diafragma, contrastando com virulencia do ciatico e das suprarenais, justamente o inverso do que se vê no caso anterior, o que se deve explicar pela séde do ponto de inoculação, que não fôra o mesmo nos dois casos.

III — E' curioso ainda observar que certos organs, baço, figado, rins, coração, testiculos, não revelam virus em quantidade suficiente para ser revelada nas doses inoculadas, que não eram despresiveis. A serosidade abundante que se forma no ponto de inoculação mostrou-se do mesmo modo avirulenta. Pelos dados classicos dos livros, a virulencia desses materiais é no entanto dada como certa ou como constante.

IV — Não se poderia pretender desses resultados uma conclusão absoluta, que eles não poderiam permitir. Uma conclusão negativa como aqui no caso, não prevalece é claro, contra um resultado positivo. E' possivel que o virus exista aqui, nalguns organs, em quantidades pequenas, dificilmente verificaveis. Mas parece conveniente assinalar

a inconstancia de virulencia de organs, ou a presença de virus, pelo menos em pequenas quantidades. A virulencia de organs não nos parece, assim, um dado constante, de facil verificação, de que se possa lançar mão. Esses dados se aplicam, é claro, aos bovinos, pois o comportamento do virus varia, como veremos, com a especie animal em experiencia, e devido a outras causas.

O virus do Aujeszky parece acentuadamente neurotropico nos bovinos e deve existir nas celulas nervosas dos organs. Ora, a virulencia dos organs, conforme interpretação de REMLINGER e BAILLY (7) e verificação de varios autores, entre os quais SCHWEINBURG, se constata igualmente na raiva.

V — Os resultados aqui obtidos na infecção experimental, e com um virus conservado por passagens cerebrais em série, no coelho, podem, é claro, não se superporem ao que se passa na infecção natural. Mas nesta não seriam facilmente realisaveis, experiencias deste genero. Adiante examinaremos um caso de infecção natural.

O caracter mais ou menos neurotropico do virus, dependendo ou podendo depender da amostra estudada, está principalmente condicionado á especie animal em experiencia. Voltaremos mais adiante ao exame desse ponto, discutido em interessantes trabalhos de HURST (2-3-4).

4.ª Experiencia. Infecção experimental do cão. Um cão mestiço fox-terrier recebe 3 cc. de uma suspensão ao decimo, de virus de cerebro de coelhos, por via subcutanea, na região da espadua.

Inoculação em 24-4-35 ás 10 horas.

Primeiros sintomas: durante a noite de 28-29-4-35. Incubação: $4\,^1/_2$ dias.

Lesão local dada pela coceira. Sacrificado em agonia em 29-4-35 ás 15 horas.

As conclusões estão na tabela 4.

TABELA 4

Pesquisa de virus em material de cão

Material inoculado	Dose	Via	Coelhos	Data de inoculação	Morte	Resultado
Cerebro	1 cc.	Muscular	9519	9-5-35		—
Medula dorsal . . .	»	»	9521	»	13-5-35	+
» lombar . . .	»	»	9522	»	14-5-35	+
Sangue colhido pouco antes do sacrificio. .	5 cc.	»	9523	»		—
Pulmão	1 »	»	9520	»		—

Ainda aqui o virus não foi obtido do cerebro, tendo sido positivos os resultados com a medula cervical e com a medula lombar. O sangue foi ainda negativo.

5.ª Experiencia. Refere-se este caso a uma verificação identica, mas obtida de um caso de infecção natural em um bovino.

Uma vaca n.º 6 da série de 12 casos ocorridos na propriedade do Sr. L. R., em Laranjal, neste Estado.

Inicio da doença: 14-1-37 ás 6 hs. Morte: noite de 15-16-1-37. Evolução entre 42-48 hs. Autopsia dia 16-1 ás 10 horas.

Foram retirados separadamente, em glicerina fosfatada de pH 7.2, grandes pedaços de cerebro e pedaços de medula cervical, dorsal e lombar, de cerebelo. Convem observar que do cerebro, como em todos os casos identicos, foram retirados fragmentos de todas as regiões, principalmente do bulbo, que do ponto de vista de constancia de virulencia é tido, na raiva, como a zona de eleição, e do corno de Ammon, do cerebelo, do lobo alfativo, da camada branca e cinzenta da cortex, das zonas da base do cerebro, etc.. Nenhuma das zonas escapou á colheita de material, realisada em um grande frasco de capacidade de 450 cc. contendo 250 cc. de liquido conservador. As inoculações foram realisadas por via subdural, que é a mais sevéra, no coelho, e o material transportado ao laboratorio foi conservado no gelo durante 2 dias, o que facilitaria a difusão do virus pela substancia nervosa, demonstrada por Remlinger e Bailly, confirmada por Gerlach e Schweinburg. As experiencias estão condensadas na tabela 5.

TABELA 5

Inoculações do material colhido da vaca n.º 6

Material inoculado	Via	Dose	Coelhos	Incubação	Duração	Morte	Resultado
Cerebro	Subdural	0.2 cc.	12816				—
»	»	»	12817				—
Medula lombar . .	»	»	12818	48 horas	2 horas	20-1-37	+
» » . .	»	»	12819	50 horas	7 horas	20-1-37	+
Medula cervical . .	»	»	12820				—
» » . .	»	»	12821				—
Cerebelo (colhido á parte)	»	»	12822				—

Inoculações feitas em 18-1-37.

Como se vê neste caso, si a colheita do material tivesse sido limitada ao cerebro, mesmo com um material muito mais abundante do que geralmente se retira nas autopsias desse genero, o virus não teria sido isolado. O prurido, neste, como em quasi todos os outros onze casos ocorridos na mesma propriedade e em numerosas outras, tem séde na região posterior do corpo, sendo então os primeiros indicios notados

na base da cauda. A vulva, a vagina, o ubere, a face interna da coxa, a região perineal, são as regiões mais atingidas pelo prurido.

A colheita do material na infecção natural tem, pois, certamente, muito maior segurança de um resultado positivo colhendo-se apenas medula lombar, do que retirando o cerebro todo, pela razão bem simples de que na infecção natural, o prurido se localisa de modo curioso e digno de nota, na região posterior do corpo.

Não se poderia admitir, como hipotese para explicar esses resultados negativos de virulencia do cerebro, ter havido qualquer causa de insucesso acidental, explicando a destruição do virus na substancia nervosa do cerebro, nem tão pouco a hipotese de uma infecção mortal auto-esterilisavel, neste como em outros casos aqui relatados. A razão nos parece clara e é a seguinte: quando, mesmo na infecção natural ou na experimental, o prurido tem sua séde na região proxima do cerebro, o virus é aí encontrado com facilidade. E quando a zona de prurido está longe do cerebro, a medula é ainda virulenta em uma autopsia tardia. Temos nesse sentido três observações demonstrativas, das quais as duas primeiras nos parecem de especial interesse, porque não é sempre que se consegue um material util para estudo na infecção natural, e além disso é rara a ocorrencia do prurido na cabeça.

A primeira observação refere-se ao fóco ocorrido em Jardinopolis. O animal doente que nos foi dado ver e autopsiar tinha a zona de coceira localisada na face esquerda do pescoço, na sua região anterior, irradiando-se a zona edemaciada pelas glandulas maxilares, base do ouvido, maxilar inferior, etc. Apenas o cerebro foi colhido e o virus foi logo isolado facilmente, embora o material tivesse permanecido no liquido conservador, á temperatura ambiente, cerca de 24 horas, em periodo de calor.

A segunda observação refere-se ao cerebro inteiro de uma vaca procedente de Tatuhy, de um caso suspeito de raiva. O cerebro, colhido pelo proprio criador, é enviado ao laboratorio em uma lata, sem adição de qualquer liquido conservador, e permanece cerca de 24 horas á temperatura ambiente, tendo permanecido ainda inteiro, durante dois dias, na geladeira. A retirada de fragmentos de substancia nervosa para inoculações foi feita em condições que não davam esperança alguma de exito, estando já a coloração e a consistencia do material comprometidas. As informações fornecidas pelo interessado não permitiam prejulgar dos resultados, mas havia razão para suspeitar de peste de coçar. Quatro cobaias são inoculadas no cerebro e por via subcutanea, e um coelho, ante o mau aspeto do material, é inoculado por via subcutanea com 1 cc. de uma emulsão espessa. As

cobaias resistem e o unico coelho inoculado, dentro de 82-90 horas tem uma zona tipica de prurido no ponto inoculado. O virus pôde ser isolado aqui de um material de cerebro, em pessimas condições de conservação.

Uma terceira observação refere-se a um caso em que, como é de regra, o prurido surgira na região posterior do corpo; o animal havia sido enterrado e o cadaver estava já em inicio de putrefação. Um pequeno fragmento de medula da região posterior do corpo é colhido em glicerina e o virus daí isolado.

6.ª Experiencia. Recentemente um coelho é inoculado com o virus da doença por via subcutanea, na face interna da coxa. Essa inoculação é então a segunda passagem em coelho de um virus recentemente isolado de Tatuhy. A inoculação é feita em 25-5-38 e no dia 28 o coelho morre com extensa zona pruriginosa. O cerebro inteiro, a medula cervical e a medula lombar são retirados separadamente e por via subcutanea inoculados a outros coelhos. O resultado foi o que vae na tabela 6.

TABELA 6

Virulencia do sistema nervoso no coelho

Material inoculado	Animais inoculados	Dose	Via	Data	Resultado
Cerebro do coelho 300	Coelho 307	1	Subcutanea	31-5-38	— Observação até 27-6
Medula cervical . . .	» 306	1	»	»	+ 4-6-38 Lesão local
» lombar . . .	» 305	1	»	»	+ 2-6-38 » »

DISCUSSÃO

Não nos parece haver duvida alguma sobre a ocorrencia mais ou menos frequente, do fato curioso, que é ausencia do virus da doença de Aujeszky no cerebro dos animais, tanto na infecção natural como na infecção experimental. E o fato se verifica não só nos bovinos, como no cão e no coelho, o que lhe dá um caracter geral.

O interesse dessas verificações é essencial, como tivemos ensejo de assinalar, no isolamento do virus na natureza para diagnostico e para estudo, e ainda na recuperação do virus na infecção experimental quando não se utilisam as vias de acesso direto e situadas proximas do cerebro.

Mas a significação desses resultados deve ser examinada de um ponto de vista diverso e mais amplo, qual seja o da *causa mortis*, isto é, da patogenia da infecção, quando o cerebro não é virulento. Sob esse aspeto, nossos ensaios aqui reunidos não teriam significação

definitiva para permitir conclusão si não encontrassem na literatura recente exemplos no mesmo sentido, que vamos referir mais adiante.

Vamos examinar separadamente e mais longamente, essas questões:

I — No que se refere, portanto, ao isolamento do virus na infecção natural, a rotina de colheita de material, que obedece em linhas gerais ao que se faz habitualmente na raiva, deve ser modificada. A alteração é simples, mas essencial. O cerebro continúa sendo uma das zonas de colheita de material para isolamento do virus quando a doença evolue sem prurido, ou quando o prurido se localisa na região anterior do corpo e sobretudo quando se localisa na cabeça: nariz, base do ouvido, focinho, região cervical anterior, base dos chifres, etc. Esta localisação é no entanto mais rara, pelo menos no Brasil e nos bovinos, unica especie animal em que a infecção natural ocorre, ou em que tem sido até hoje possivel verifica-la. FRÖHNER e ZWICK (1) referem que o prurido se manifesta ordinariamente na cabeça, e essa observação deve ser tomada como constatada na Ungria. Tivemos ocasião de ver dois casos apenas em que o prurido existia na cabeça: no fóco de Jardinopolis e no caso ocorrido em Tatuhy; em ambos o virus foi obtido do cerebro. Este deve ser ainda retirado e utilisado para inoculações quando a doença evolue sem a presença de prurido, que é a sua melhor caracteristica clinica.

Toda vez, porém, que o prurido se manifesta em uma região mais distante do cerebro, e essa localisação constitue a regra, é a medula correspondente á zona em que se desenvolve o prurido que constitue o material de escolha. Considerando que, embora não haja estatisticas nesse sentido, o prurido surge na região posterior do corpo em cerca de 70-80 % dos casos, na infecção dos bovinos no Brasil, é a medula lombar que constitue o material de eleição para isolamento do virus da infecção natural. Essa indicação é aplicavel ás outras especies em que a doença ocorre na natureza.

A medula é ainda um material indispensavel, de colheita obrigatoria, quando se realisa a infecção experimental por inoculação na face interna da coxa, na pata, no testiculo, emfim em zonas situadas longe do cerebro, para recuperação do virus inoculado.

Nossa conclusão se afasta, neste particular, da a que chegaram REMLINGER e BAILLY (11) que, estudando em condições diversas de experiencia, e usando outras vias de inoculação, a existencia de regiões avirulentas no sistema nervoso central dos animais, escrevem que «a medula lombar deve ser evitada em todos os casos».

Nossos ensaios, comparados com os referidos pelos autores citados, mostram no entanto que as condições diversas de trabalho explicam a divergencia dos resultados. Em primeiro logar, os autores franceses não tomam em consideração a infecção natural e não o poderiam fazer porque a doença não existe na região em que eles trabalham, E, como vimos, a localisação do prurido na infecção natural tem uma importancia fundamental. Em segundo logar a conclusão a que chegam os mesmos autores, de se despresar a medula lombar, parece surgir de experiencias conduzidas por inoculações na camara anterior do olho (experiencias 1-2-3-4), por via subdural (exp. 7-9), ou por ingestão (exp. 8). Nos ensaios em que a inoculação de virus é feita por via venosa, na safena do cão (exp. 5-6), os resultados se aproximam dos nossos e os cordões superiores e inferiores da medula lombar são virulentos. As mesmas experiencias (5-6) são ainda demonstrativas quando revelam a virulencia dos cordões superiores da medula dorsal em ambos os casos e do cordão inferior da medula cervical, em um caso.

Ha ainda a notar, nas mesmas experiencias desses autores, a ausencia de virus em todas as zonas do cerebro que lhes serviram separadamente para inoculações: piramide do colo do bulbo, tuberculo quadrigemio posterior, substancia branca do trigono, corno de Ammon, lobo mediano do cerebelo, camada cinzenta do gyrus sigmoide. Aí está, além disso, quando se utiliza a inoculação endovenosa, na safena do cão, um belo exemplo de ausencia do virus no cerebro, mesmo naquelas zonas eletivas de pesquisa do virus, determinadas pelos proprios autores.

No quadro geral de suas interessantes experiencias de eletividade de zonas de virulencia do cerebro (11) é facil ver que em 10 ensaios a via de inoculação utilisada pelos autores foi a camara anterior do olho, veia safena, subdural e ingestão. Não ha inoculação alguma realisada por via subcutanea ou intramuscular na face interna da coxa, ou por escarificação nessas regiões, ou por inoculação intratesticular. As duas primeiras vias: subcutanea e intramuscular, são de regra as de que nos servimos nos nossos ensaios no coelho, na cobaia e mesmo nos bovinos e em outras especies e são as que mais se aproximam do quadro que se vê na infecção natural.

Assinalamos em paginas anteriores, que a colheita de material alcançando o cerebro obedece, de um modo geral, á rotina do que se faz na raiva e em outras doenças nervosas. Mas ainda aqui ha necessidade de um reparo. Em 1929 Koch (5) chamava a atenção para a possibilidade do virus rabico não existir em certas zonas do

cerebro e assinalava que essa ocorrencia devia ser tomada em conta sobretudo nas formas espinais da doença. A questão foi depois examinada por REMLINGER e BAILLY (7) em uma memoria sobre a raiva, e embora os resultados negativos sejam aqui muito mais raros que na doença de Aujeszky, os autores aconselham simplesmente retirar um material volumoso, alcançando a substancia branca e a substancia cinzenta, ou, si se preferir, retirar material de varias zonas, distantes umas das outras. Tem sido essa sempre a conduta habitual das nossas autopsias, não só na infecção natural como na experimental. E' um detalhe que tem o seu interesse pratico.

Na literatura moderna da doença de Aujeszky ha outros trabalhos relativos a esse ponto que devem ser analisados.

Estudando a infecção no coelho inoculado na perna, por via intramuscular, subcutanea, intradermica, ou no flanco, por via subcutanea, HURST (2) tem resultados que se aproximam dos que descrevemos. Em cinco coelhos assim inoculados, apenas um revelou virus no cerebro. Nos outros a medula situada proxima ao ponto em que foi feita a inoculação, assim como o nervo correspondente, revelaram o virus, e a cortex não o tinha. Os resultados do referido autor estão condensados no quadro 1 do seu trabalho. Estudando em seguida a infecção experimental no macaco e a distribuição do virus por inoculação no ciatico, HURST (4) tem ainda, embora realisando inoculações de material de varias zonas do cerebro, colhido separadamente e de medula, resultados quasi constantes de presença de virus na medula lombar e cervical, enquanto as inoculações de cerebro de 7 casos dão 3-4 resultados negativos.

II — Um outro ponto que deve ser examinado é o concernente ao caracter pantropico ou neurotropico do virus da doença de Aujeszky.

Estudando a virulencia comparada do sangue e do cerebro no coelho, REMLINGER e BAILLY (9) assinalam que essa virulencia do sangue tem uma regularidade schematica. Nas outras especies os resultados são muito mais raros, embora as experiencias tenham sido feitas em raros casos. Fica em suspenso a conclusão de que a disseminação do virus se faça por via sanguinea, linfatica, ou nervosa. HURST (4) conclue que embora circule no sangue, mesmo no coelho, o virus alcança o sistema nervoso central pelos nervos perifericos. As nossas experiencias atraz referidas, embora em numero reduzido, falam no mesmo sentido, merecendo destacar nesse particular a facilidade com que se encontram o ciatico e as capsulas suprarenais virulentas quando a inoculação foi feita na face interna da coxa; em uma segunda

experiencia a medula dorsal e o diafragma são virulentos quando a inoculação foi feita na espadua.

HURST vae mais longe e conclue que é necessario considerar o comportamento do virus da doença de Aujeszky de acordo com a especie animal. Enquanto no coelho ele é pantropico, no macaco só tem afinidade pelas celulas nervosas e é puramente neurotropico. Para o futuro, assinala o autor, quando se classificar um virus, é necessario especificar a especie animal em que as experiencias foram realisadas. E' uma conclusão importante e que se insurge contra a tendencia de generalisar resultados obtidos em animais de laboratorio, aplicando-os a outras especies. O virus de Aujeszky fornece um exemplo tipico nesse sentido, pelo seu comportamento: pantropico no coelho, tipo de animal sensivel, mas neurotropico no macaco e no boi.

Essa conclusão é baseada em cuidadoso estudo histologico no coelho, na cobaia, no macaco e no boi, em que o trajeto das lesões e a presença de inclusões assinalam o trajeto do virus. Os resultados de nossas inoculações, das tabelas 2 e 3, incluem-se nessa interpretação e é impressionante a série de resultados negativos nas nossas inoculações feitas com organs, quando ao contrario os troncos nervosos proximos do ponto de infecção e os organs visinhos e de rica rede nervosa, deram com facilidade um resultado positivo, demonstrando grande quantidade de virus. Embora em pequeno numero, essas experiencias têm o seu interesse porque nem sempre é facil realisar ensaios desse genero em grandes animais. O caracter neurotropico do virus nos bovinos deve explicar uma virulencia menos constante do sangue, como temos verificado em ensaios não concluidos.

Para terminar vejamos qual é, á luz dos dados de que dispomos, a interpretação que se póde ou se deve dar á ausencia de virus no cerebro dos animais, na doença de Aujeszky.

Quatro hipoteses são discutiveis no caso:

I — O virus pode ocasionar a morte antes de alcançar o cerebro.

II — O virus sofreu a influencia de uma infecção mortal autoesterilisavel.

III — O virus existiria no cerebro em pequena quantidade, não revelavel pelos processos normais de investigação.

IV — A virulencia do cerebro depende de zonas eletivas em que o virus é encontrado.

I — A primeira hipotese surge em uma nota de REMLINGER e BAILLY (8). Parece-nos a mais acertada para explicar a maioria desses

casos, pelo menos. A morte se dá antes que o virus tenha alcançado o cerebro. Acreditamos que os dados aqui referidos trazem um argumento ou uma confirmação nesse sentido, tendendo a fixar a interpretação dos autores citados: a evolução rapida da doença, os disturbios respiratorios graves, a presença de virus no diafragma, o resultado negativo das inoculações de cerebro, a ausencia de fenomenos cerebrais, o comprometimento de organs importantes como as capsulas suprarenais, indicam uma ação local direta de virus, capaz de determinar a morte independentemente do comprometimento do cerebro. REMLINGER e BAILLY consideram porém que a morte se dá quando a doença está na fase sanguinea, sendo suas experiencias realisadas por via subdural. Parece preferivel concluir, quando se realisa a infecção natural, ou quando se realisa a inoculação na coxa, que a morte se dá quando a doença se encontra ainda em uma fase que se poderia dizer m e d u l a r, comprometendo além disso organs importantes, de rica inervação. Pelo menos nos animais em que o virus é acentuadamente neurotropico, essa interpretação parece mais justa.

Estudando a histologia da doença, HURST (4) não encontra inclusões nem lesões no cerebro dos coelhos inoculados por via intradermica, subcutanea, ou intramuscular; as lesões e a presença de inclusões são assinaladas no local de inoculação, nos ganglios espinais e segmentos da medula correspondentes ao ponto de infecção. A infecção é ascendente e é facil seguir o seu trajeto pelas lesões e pela presença de inclusões. A cortex, o cerebelo e o cerebro foram examinados, do ponto de vista de lesões, com resultados negativos. Na cobaia inoculada nas mesmas condições, o cerebro pode revelar inclusões, nos casos de evolução prolongada. Por inoculação subcutanea, ou intramuscular, no coelho, assinala HURST, a morte se dá por sincope respiratoria, alcançando o virus a medula pouco antes da morte. Os centros medulares do coelho, continúa o mesmo autor, são particularmente susceptiveis ao virus, de modo que uma quantidade minima, atuando por curto tempo, é suficiente para paralisar a função desses centros.

Cabe nessa interpretação uma observação nossa, realisada em um bovino. Um dos nossos garrotes, inoculado na espadua, por via subcutanea, teve uma sintomatologia respiratoria grave e alarmante, com contrações diafragmaticas violentas, respiração acelerada, profunda e discordante. Um diagnostico clinico de sincope respiratoria parecia o acertado. Pela autopsia, o virus estava ausente do cerebro, presente na medula e no diafragma.

Esses argumentos, rapidamente reunidos, permitem falar, ao menos por enquanto, na ocorrencia da morte sem que o virus tenha alcançado o cerebro, embora pareça que REMLINGER e BAILLY tenham aban-

donado a hipotese depois que estudaram a electividade das zonas de virulencia. Estamos convencidos de que existem de fato casos em que o virus não é encontrado no cerebro e nos quais a avirulencia de zonas não explica o resultado negativo das inoculações.

II — A primeira impressão ante esses resultados é a de que se trata de um fenomeno de autoesterilisação no cerebro dos animais, fenomeno estudado em varias doenças do mesmo grupo desde a concepção de Levaditi, como sejam a encefalomielite americana dos equideos, a doença de Borna, a raiva, o herpes, etc. Não nos parece que assim seja no nosso caso, embora a infecção mortal autoesterilisavel tenha sido assinalada na doença de Aujeszky, por Nicolau, Cruveilhier e Kopciowska (6), em um coelho inoculado no ciatico, morto ao cabo de 3 dias, com lesões no cerebro e na medula; as passagens de cerebro são negativas e as da medula dorsal positivas. O criterio de infecção mortal autoesterilisavel dos referidos autores está baseado no exame histologico do cerebro, que foi positivo no caso. Mas parece-nos rara a ocorrencia desse fenomeno porque nas inoculações subdurais no coelho, por passagem em série, nunca nos foi possivel registrar um só insucesso e as nossas inoculações com esse objetivo contam-se ás centenas, utilisando varias amostras de virus. Além disso, quando o prurido se desenvolve proximo do cerebro o virus é aí facilmente encontrado.

III — O virus existiria no cerebro em quantidades minimas, não revelaveis pelos processos habituais de investigação. E' possivel a ocorrencia de casos inclusiveis nesta explicação, pois mesmo nas nossas observações ha uma em que um resultado negativo foi a principio registrado e em que, passando da dose de 1 cc. para a de 5 cc., de material inoculado, transformamos um resultado negativo em positivo.

IV — Uma outra interpretação seria dada pela existencia de zonas avirulentas no cerebro dos animais, questão especialmente estudada por Remlinger e Bailly (10-11). Mas os fatos aí estudados não se aplicam aos nossos resultados, pois a maioria de suas experiencias se refere a inoculações realisadas em vias situadas proximas do cerebro. Como tivemos ocasião de assinalar em paginas anteriores, no proprio quadro de experiencias dos autores citados (11), encontramos duas observações que falam a favor de uma ausencia total do virus no cerebro: nas experiencias realisadas por inoculação na safena do cão, enquanto os cordões medulares são virulentos, todas as zonas eletivas para presença de virus no cerebro, fornecem resultados negativos e as inoculações são feitas utilisando seis zonas diversas do cerebro e realisando inoculações de 0.3 cc., por via subdural, no coelho.

Resumindo, para concluir, deparamos quatro interpretações para explicar os resultados negativos assinalados na pesquisa de virus no cerebro: I — ausencia total de virus no cerebro, ocorrendo a morte antes que o virus aí tenha chegado; II — presença do virus em pequena quantidade; III — existencia de uma infecção mortal autoesterilisavel; IV — presença do virus em zonas eletivas.

Todas essas interpretações devem se traduzir em resultados reais. Para a primeira e para a segunda trazemos aqui algumas observações que não nos parecem merecer duvida: o virus pode deixar de existir no cerebro e a morte dar-se pelo comprometimento da medula, ou de organs de rica inervação. Na infecção natural é possivel que inumeras veses esse fato se verifique: ele explica os resultados negativos de inoculações realisadas quando a doença evoluiu de modo tipico, com ponto de infecção distante do cerebro. Em outros casos o virus alcança o cerebro mas aí existe em pequena quantidade.

A infecção autoesterilisavel deve ser rara na doença de Aujeszky e explicaria outros casos de insucesso. Finalmente, a questão da avirulencia de zonas não parece ter um interesse pratico muito grande, porque depende certamente, nas experiencias realisadas, da via utilisada. Praticamente, o cuidado de colher material abundante em varias zonas do cerebro, quando o prurido se localisa em regiões proximas, satisfaz plenamente, evitando insucesso nas inoculações para isolamento do virus.

CONCLUSÕES

A virulencia do sangue e dos organs na doença de Aujeszky não é um dado constante que permita resultados positivos frequentes, quando se estuda a doença em bovinos. Ela se encontra mais nos organs de rica rede nervosa e situados proximo ao ponto de infecção, devendo decorrer da virulencia das celulas nervosas desses organs.

Qualquer que seja a interpretação da ausencia do virus no cerebro dos animais na doença de Aujeszky, é inegavel que com os processos habituais de inoculação e mesmo com doses consideraveis de material, o cerebro inoculado revela frequentemente resultados negativos. Esses resultados são vistos no coelho, nos bovinos, no cão, na infecção experimental como na natural.

A ausencia total de virus no cerebro não parece merecer duvida, ocorrendo a morte antes do virus ter alcançado o cerebro, pelo comprometimento da medula espinal e dos organs correspondentes, principalmente os de rica rede nervosa.

A infecção mortal autoesterilisavel deve ser muito rara na doença de Aujeszky, pois nas passagens cerebrais em série, no

coelho, por via subdural, com sete amostras diversas de virus, e mais de duzentas inoculações, nunca nos ocorreu um insucesso.

A presença de virus em pequena quantidade no cerebro pode ocorrer e nesse caso doses consideraveis de material inoculado permitem obter o virus.

A avirulencia de zonas no cerebro dos animais verificada por REMLINGER e BAILLY mostra o interesse pratico de se realisar uma colheita abundante de material nervoso, de zonas diversas. Esta simples precaução permite evitar essa causa de erro.

No isolamento do virus da infecção natural e na recuperação do virus dos animais inoculados, quando se usam vias de inoculação situadas longe do cerebro, — a rotina de colheita de material deve ser modificada. E' a medula situada proxima ao ponto em que se desenvolve o prurido que constitue o material de eleição a ser colhido. A rotina de se retirar apenas o cerebro explica os insucessos nas tentativas de isolamento do virus quando a doença evoluiu de modo tipico.

Considerando que na infecção natural o ponto de infecção, que é a séde do prurido, está situado na grande maioria dos casos, na região posterior do corpo, é a medula lombar que constitue o material mais adequado ao isolamento do virus da natureza.

O virus de Aujeszky tem nos bovinos um caracter acentuadamente neurotropico, ao contrario do que se vê no coelho, e a virulencia de medula e de organs de rica inervação falam no sentido da difusão do virus por via nervosa.

ABSENCE OF THE VIRUS OF AUJESZKY'S DISEASE IN THE BRAIN OF ANIMALS.

Abstract

This paper deals with the study of the absence of the virus in the brain of animals in a case of natural infection and in those inoculated subcutaneously in points far removed from the brain. It discusses the interpretation of these cases, the neurotropic character of the virus in cattle, modifying the usual routine for the collection of the material for the isolation or recuperation of the virus, leading to the following conclusions:

I — The virulency of the blood and the organs in Aujeszky's disease is not a constant factor that permits of frequent positive results, when the disease is studied in cattle. It is especially observed in the organs that are rich in nerves, located near to the point of infection.

II — Whatever the explanation be for the absence of the virus in the brain of animals suffering from Aujeszky's disease — as death before the virus reaches the centers, autosterilizable infection, small quantity of virus, electivity of zones, — it is undeniable that with the usual methods of inoculation and even with large doses of material, the inoculated brain frequently shows negative results. These results are observed in rabbits, in cattle, in the dog, both in the natural and experimental infection.

III — There is no doubt about the complete absence of the virus in the brain, death taking place before the virus has reached the brain, the virus being localized in the spinal medulla and corresponding organs, especially in those richly provided with nerves.

IV — The lethal autosterilizable infection must be very rare in Aujeszky's disease, as, by continued passages, in the rabbit, subdurally, with seven different strains of the virus, and more than two hundred inoculations, we never had a failure.

V — A small quantity of virus may appear in the brain and in this case it may be obtained through the inoculation of large doses of the material.

VI — The question of nonvirulency of zones in the brain of animals studied by Remlinger *and* Bailly, *shows the practical interest of making an abundant collection of nervous material, from various zones. By the observance of this simple precaution this cause of error is avoided, when the center of the itching is located near the brain.*

VII — The routine of the collection of material must be modified in the isolation of the virus in natural infection and in the recuperation of the virus in inoculated animals, when the inoculation is made in points far from the brain. The part of the medulla situated near the point where the itching is observed, constitutes the material to be chosen. The usual custom of removing only the brain explains the insuccesses in the attemps of isolation of the virus when the disease had a typical course.

VIII — Considering that in the natural infection the point of infection, which is the center of the itching, is located, in the majority of cases, in the posterior region of the body, — base of the tail, perineal zone and the external genital organs, — the lumbar medulla constitutes the chosen material for the isolation of the virus in the natural infection.

IX — Aujeszky's virus has a pronounced neurotropic character in cattle, the contrary being observed in rabbits; and the virulency of the medulla and of the organs richly provided with nerves leads to the idea of the difusion taking place through the nerves.

BIBLIOGRAFIA

1 — Fröhner, E. y Zwick, G. — 1926 — Patologia y Terapeutica Veterinarias. II, 530. Gustavo Gili editor, Barcelona.
2 — Hurst, W. — 1933 — Studies on pseudorabies, *J. Exp. Med.*, **58**, 415-433.
3 — Hurst, W. — 1934 — Studies on pseudorabies, *J. Exp. Med.*, **59**, 729.
4 — Hurst, W. — 1936 — Studies on pseudorabies. *J. Exp. Med.*, **63**, 449-463.
5 — Koch, J. — 1929 — Ein Beitrag zur Klinik und Pathologie der paralytischen und atypischen Lyssa humana. *Centralblatt für Bakteriologie*, **113**, 376-392.
6 — Nicolau, S., Cruveilhier, L. et Kopciowska, L. — 1937 — Etude sur la pseudo-rage expérimentale. *C. R. Soc. Biol.*, **126**, 563.
7 — Remlinger, P. et Bailly, J. — 1931 — Etudes sur la rage. *Ann. Inst. Pasteur*, **47**, 608-659.
8 — Remlinger, P. et Bailly, J. — 1933 — Le siège du virus dans la maladie d'Aujeszky expérimentale. *C. R. Soc. Biol.*, **113**, 125.
9 — Remlinger, P. et Bailly, J. — 1935 — Contribution à l'étude du virus de la maladie d'Aujeszky expérimentale, *Ann. Inst. Pasteur*, **54**, 149-184.
10 — Remlinger, P. et Bailly, J. — 1937 — Existence de regions avirulentes dans le système nerveux central des animaux morts de la maladie d'Aujeszky. *C. R. S. Biol.*, **124**, 326.
11 — Remlinger, P. et Bailly, J. — 1937 — Contribution à l'etude du virus de la maladie d'Aujeszky. Troisième memoire. *Ann. Inst. Pasteur*, **59**, 5-38.

———o———

Vol. 9 — Art. 23 Dezembro de 1938

AÇÃO DA SULFANILAMIDA SOBRE A INFECÇÃO POR "PASTEURELLA AVICIDA" EM AVES

POR

D. M. Cardoso, P. Nobrega e J. Reis

Do Instituto Biologico de S. Paulo

Efeitos beneficos temporarios e muito leves da p-aminobenzenosulfonamida nas infecções por *P. pseudotuberculosis* e *P. septica,* em camondongo, são referidos por BUTTLE e cols., baseados em experiencias preliminares, de que não descrevem minucias.

LEVADITI e REINIÉ estudam a ação de diversos derivados benzenicos sulfurados de função sulfamida, sulfona ou sulfoxida sobre a infecção de camondongo e galinha por *Pasteurella avicida;* administrando a droga por via oral pouco antes da infecção e repetindo quando necessario, assinalam «atividade terapeutica evidente dos preparados, e especialmente da p-aminofenilsufamida». A ação da droga é avaliada pelo numero de animais sobreviventes nos dez dias que se seguem á inoculação. O exame das tabelas que apresentam revela que ao fim de dez dias grande maioria dos animais tratados, assim como dos controles, não sobrevive.

Nas experiencias que vamos referir, e que já se achavam quasi terminadas ao termos conhecimento do trabalho dos autores franceses de que são portanto independentes, usamos a sulfanilamida por via parenteral, suspensa em oleo.

MATERIAL E METODOS

Sulfanilamida. A sulfanilamida era suspensa em oleo de amendoim, fazendo-se diluições a 30 e 20 %; tais soluções são muito espessas e devem ser injetadas com agulha bem grossa. No momento de injetar, a solução era aquecida em banho-maria e agitada fortemente, para homogeneizar.

A sulfanilamida era injetada por via muscular, nos musculos do peito. Em todas as experiencias apenas se fez uma unica aplicação da droga.

Pasteurella avicida. Usamos culturas sempre recentes de amostras altamente virulentas e do tipo fluorescente. As diluições referidas no texto referem-se sempre a culturas de 24 horas, em caldo simples.

Animais. As experiencias foram feitas com galinhas e frangotes de raça *Leghorn* branca, e com pombos.

Dosagem da sulfanilamida no sangue. Foi feita de acôrdo com a tecnica descrita por MARSHALL, que dá excelentes resultados e é de facil realização. Apresenta um unico inconveniente: o aparecimento de uma turvação que não é completamente evitada mesmo após mais de uma filtração, o que dificulta um pouco a leitura no colorimento. Fazendo a precipitação das proteinas do sangue com acido tricloracetico a 5 % e não com alcool como faz MARSHALL, conseguimos evitar completamente a turvação.

ELIMINAÇÃO DA SULFANILAMIDA INJETADA

Para nos orientarmos na escolha da dose otima a ser administrada, e do intervalo entre a injeção da sulfanilamida e a inoculação do germe, fizemos varias determinações desta substancia no sangue de galinhas injetadas com doses diversas. Por esse meio podemos fazer uma idéa da velocidade de absorção e da eliminação da droga, o que é de importancia fundamental no tratamento.

Injetamos duas galinhas adultas com 1 grama, e duas outras com 0.5 gr. de sulfanilamida em suspensão oleosa; fizemos dosagens da droga no sangue em horas diferentes após as injeções. Na tabela 1 encontram-se os resultados dessas dosagens.

TABELA 1

Concentração da sulfanilamida no sangue de galinhas injetadas com suspensões oleosas da droga

Gals. n.o	Sulfanil. injetada	Mgrs. de sulfanilamida por 100 cc. de sangue após									
		3 hs.	6 hs.	9 hs.	15 hs.	20 hs.	24 hs.	33 hs.	39 hs.	48 hs.	65 hs.
1	1 gm.	4.87	5.55	8.88			14.81	15.30		9.52	
2	1 gm.				29.32	23.52			11.11		4.44
3	0.5 gm.	3.17	5.38	8.70			6.45			2.77	
4	0.5 gm.				13.79	8.88			4.34		0.87

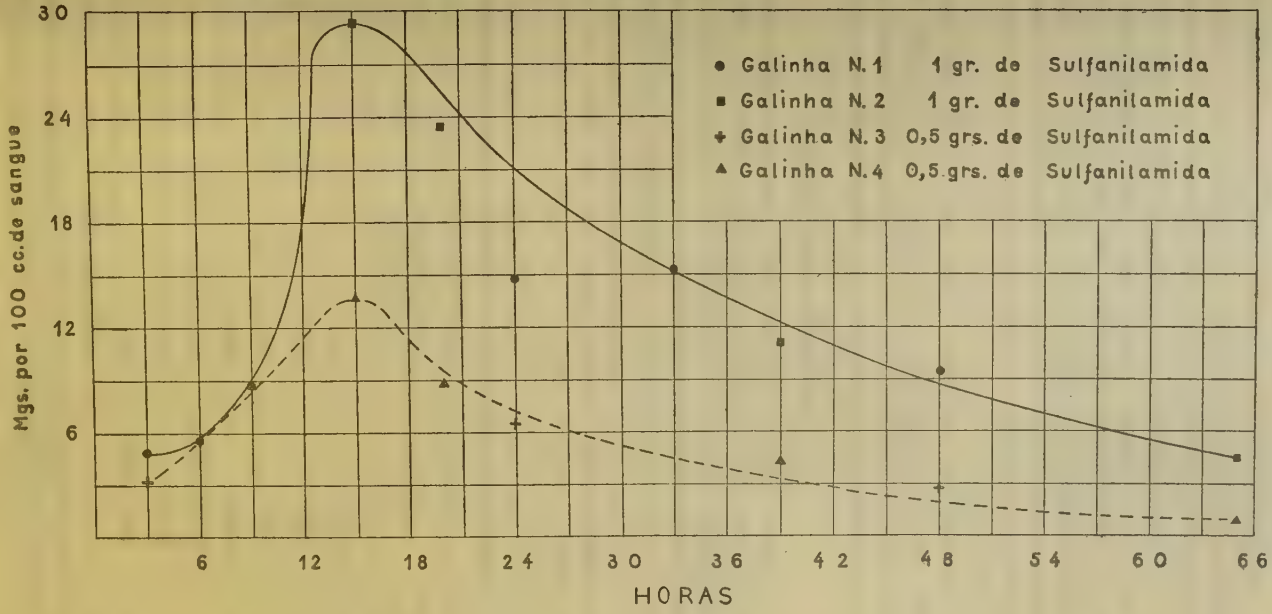
No grafico reunimos os valores obtidos; as curvas representam a modificação da taxa de sulfanilamida no sangue. As curvas são muito semelhantes, havendo apenas a diferença decorrente da diversidade de doses usadas.

A concentração maxima é observada 15 horas, aproximadamente, após a injeção.

Uma taxa de 6-10 mgs. por 100 cc., que em geral se revela eficaz contra infecções bacterianas, (4) obtem-se em nosso caso 6 horas após a injeção, independentemente da quantidade administrada.

GRAFICO

Absorção e eliminação da sulfanilamida em galinhas adultas injetadas com suspensões oleosas da droga. As curvas representam as concentrações de sulfanilamida no sangue diversas horas após a injeção intramuscular.



Observa-se diferença sensivel entre as duas curvas na parte que se refere à eliminação da droga. Nas aves injetadas com 1 gm. a taxa de sulfanilamida mantem-se no nivel eficiente por quasi 60 horas, ao passo que nas injetadas com 0.5 gm. a taxa eficiente não é mantida por mais de 24 horas. Dependendo a ação quimioterapica, em grande escala, do tempo que a substancia atua sobre o germe, é facil perceber a vantagem da dose maior, o que a experiencia, aliás, confirmou, demonstrando que 0.5 gm. é dose insuficiente e que, para conseguir proteção contra a infecção, é necessario injetar de 0.6 a 1.0 gm. por ave, em média 0.8 gm.

Comparando os dados acima com os que têm sido em geral obtidos com sulfanilamida por via oral ou em injeções de soluções aquosas (4), ressalta a vantagem da suspensão oleosa, que garante maior persistencia da taxa eficaz de sulfanilamida no sangue.

EXPERIENCIA EM FRANGOS

Usamos frangos *Leghorn* brancos, de peso medio de 400-600 grs., e idade aproximada de 3 a 4 mêses, todos machos. A tabela 2 resume as experiencias feitas, e mostra claramente a importancia que tem, para a apreciação da ação da sulfanilamida, a quantidade de germes utilizada. Assim, a dose de 0.800 grs. de sulfanilamida, que protege seguramente 78 % dos animais inoculados com 0.001 cc. de caldo, de 24 horas, não confere proteção alguma contra 0.1 de cultura e é muito pouco eficaz contra a dose de 0.01.

TABELA 2

Ação protetora da sulfanilamida em frangos inoculados simultaneamente com *Pasteurella avicida.*

Numero de frangos	Dose de sulfanilamida em grs.	Dose de *Pasteurella* em cc. de cult. caldo 24 hs.	N.o de mortes	N.o de sobrevidas	Porcentagem de sobrevidas
23	0.800	0.001	5 xx	18	78 %
5	0.400	0.001	5	0	0 %
5	0.800	0.01	4	1	20 %
5	0.400	0.01	5	0	0 %
4	0.500 - 0.600	0.01	1 x	3	75 %
4	0.800	0.05	1	3	75 %
15	0.400 - 0.800	0.1	15	0	0 %
23	0	0.001 - 0.05 - 0.1	23	0	0 %

x. Indica morte tardia, ao fim de 8 dias. Os controles morrem em 16-48 hs. em geral.
xx. Destes animais, 3 morreram de 6 a 10 dias e dois de 15 a 28 dias, respetivamente, após inoculação.

EXPERIENCIA EM GALINHAS

TABELA 3

Ação da sufanilamida em galinhas inoculadas simultaneamente com *Pasteurella avicida*

N.o de animais	Dose de sulfanilamida em grs.	Dose de *Pasteurella* em cc. de cult. caldo 24 hs.	N.o de mortes	N.o de sobrevidas
8	0.600 - 0.800	0.01	4x	4
3	0.400 - 0.600	0.1	1	2
3	0.800 - 0.900	0.1	1	2
9	0	0.01 - 0.1	9	0

x. Duas dessas aves morreram tardiamente, de 6 a 10 dias, quando os controles sucumbem geralmente em 48-72 horas.

TABELA 4

Ação da sulfanilamida em galinhas (resumo da tabela 2)

N.o de animais	Dose de sulfanilamida	N.o de mortes	N.o de sobrevidas	Porcentagem de sobrevidas
14	400 - 900 mg.	6	8	57 %
9	0	9	0	0 %

Tambem chamamos a atenção para a importancia que tem a observação prolongada dos animais em experiencia, pois a morte deles pode sobrevir muito tardiamente (até 28 dias após).

EXPERIENCIAS FEITAS EM POMBOS

Não foram numerosas as experiencias feitas em pombo, animal muito mais sensivel que a galinha à infecção experimental. Pudemos, entretanto, observar que de 5 pombos injetados com doses de 150-450 mgrs. de sulfanilamida sobreviveram 2, tendo os tres restantes a morte retardada (de 3 a 7 dias, quando os controles morreram em menos de 24 horas). De dois pombos inoculados com 0.001 cc. de pasteurela 6 horas após a administração de 150 mgrs. de sulfanilamida, sobreviveu um e o outro teve a morte retardada tres dias.

EXPERIENCIAS EM QUE MEDEIA CERTO LAPSO DE TEMPO ENTRE A ADMINISTRAÇÃO DA SULFANILAMIDA E DO GERME

Tres frangos recebem de 500-600 mgrs. de sulfanilamida e, 2 horas após, 0.01 cc. de cultura caldo de pasteurela, de 24 horas; sobrevivem todos.

Verificamos ainda que 0.800 grs. de sulfanilamida protegem galinhas adultas contra a pasteurela injetada 5, 16, 24 e 48 hs. depois, nas doses de 0.1 e 0.01.

TOLERANCIA DAS GALINHAS EM RELAÇÃO Á SULFANILAMIDA

Em experiencias preliminares verificamos que as galinhas toleram perfeitamente a injeção intramuscular de sulfanilamida, em doses altas, que podem atingir 1.5 gr. por quilo de peso vivo (dose maxima experimentada).

IMUNIDADE DAS AVES INJETADAS COM PASTEURELA MAIS SULFANILAMIDA

Em duas galinhas e cinco frangos que haviam sido protegidos contra doses mortais de pasteurela, respetivamente 0.01 e 0.001 por 0.800 grs. de sulfanilamida, verificamos o estabelecimento de solida imunidade, provada respetivamente 27 e 25 dias após, pela inoculação de novas doses seguramente mortais, do germe (cerca de 100 doses mortais minimas). Tais aves puderam, por isso, servir á preparação de sôros imunes.

AÇÃO BACTERIOSTATICA DA SULFANILAMIDA SOBRE A «P. AVICIDA» IN VITRO

Usamos a pasteurela P 294, de nossa coleção, a qual representa amostra virulenta de *P. avicida,* de tipo fluorescente. A amostra era

TABELA 5

Ação bacteriostatica da sulfanilamida, *in vitro,* sobre amostra de *P. avicida*

	Diluições do inóculo								
	Tempo de leitura	10-1	10-2	10-3	10-4	10-5	10-6	10-7	10-8
Caldo simples	24 hs.	+	+	+	+	+	+	—	—
	102 hs.	+	+	+	+	+	+	—	—
Caldo simples + sulfanilamida	24 hs.	+	+	+	—	—	—	—	—
	102 hs.	+	+	+	+	—	—	—	—
Caldo sangue	24 hs.	+	+	+	+	+	+	+	—
	102 hs.	+	+	+	+	+	+	+	—
Caldo sangue + sulfanilamida	24 hs.	+	+	+	—	—	—	—	—
	102 hs.	+	+	+	+	—	—	—	—

semeada em caldo simples com traços de sangue hemolisado e incubada a 37° por 24 hs.; desta cultura faziam-se diluições sucessivas, de 10^{-1} a 10^{-9}, de cada uma das quais se semeava uma quantidade constante em 4 tubos contendo respetivamente: a) caldo simples; b) caldo simples mais traços de sangue hemolisado; c) caldo simples mais sulfanilamida; d) caldo simples com sangue hemolisado mais sulfanilamida. A sulfanilamida era adicionada ao caldo em quantidade tal que perfazia uma concentração de 1:10.000 em cada tubo (10 mgr. %) Depois de semeados, os tubos eram incubados a 37° e observados após 24, 48, 72 e 120 horas.

Os resultados estão resumidos na tabela 5, onde apenas consignamos a primeira e a ultima das leituras feitas (24 e 120 horas).

ACTION OF SULFANILAMIDE ON THE INFECTION CAUSED BY "PASTEURELLA AVICIDA"

Abstract

The Authors' purpose was to study the action of sulfanilamide on the course of experimental fowl-cholera. The drug was used suspended in oil and by intramuscular route.

Determination of the drug in the blood, carried out according to MARSHALL'S *method, showed that a concentration of 6-10 mgs. per 100 cc. blood is reached 6 hours after the injection of both 1 and 0.5 gm. of sulfanilamide into the breast muscle of the fowl; this concentration, which in many instances has proved to be an effective one against infections by different kinds of germs, is maintained for a relatively long time (almost 60 hours) in birds receiving 1 gm. of sulfanilamide; in birds treated with only 0.5 gm. the same effective concen tration cannot be sustained for more than 24 hours (see table I and chart) These findings strongly emphazize the importance of administering sulfanilamide in the way and by the route above described.*

Pullets which receive at the same time, but in different points of the body, 0.800 gm. of sulfanilamide and 0.001 cc. of a 24 hours broth culture of P. avicida show a marked resistance against the infection, as shown by the high percentage of survivals, (78 %) as compared to the hundred percent mortality among untreated controls. From table 2 one may draw interesting conclusions about the importance of the dose of Pasteurella chosen to test the resistance conferred upon the birds by the sulfanilamide treatment.

Similar experiments carried out with fowls show that with doses of sulfanilamide ranging from 400-900 mg., we can obtain, on the whole, 57 % of survivals. (tables 3 and 4).

The preventive action of sulfanilamide is also marked when a certain time, ranging from 2 to 48 horus, is allowed to elapse between the injection of the drug and the inoculation of P. avicida.

Birds which have withstood the simultaneous injection of sulfanilamide and P. avicida, show marked immunity when tested a month later with about 100 MLD of the same microbe. Such birds may be utilized for the preparation of immune serum by the injection of increased doses of living samples of P. avicida.

Table 5 presents the results of some bacteriostatic tests performed with P. avicida and sulfanilamide.

During their experiments, the Authors frequently noticed that some of the treated birds come to die very lately (for instance: 28 days) after the inoculation of the germ. This fact should be borne in mind when we intend to express our results in percent mortality, since the apparent percentage of survivals would possibly seem much better than the real one, if we made is a rule not to keep the animals under observation for more than a few days.

BIBLIOGRAFIA

1 — Buttle, G. A. H., Parish, H. J., McLeod, M. e Stephenson, D. — 1937 — The chemotherapy of typhoid and some other non-streptococcal infections in mice. *The Lancet,* 20 de Março: 681.

2 — Levaditi, C. e Reinié, L. — 1938 — Chimiothérapie de l'infection déterminée chez la souris et la poule par la Pasteurela avicida. *Compt. rend. Soc. Biologie,* **127,** (13): 1179-1180.

3 — Marshall Jor., E. K. — 1937 — Determination of sulfanilamide in blood and urine. *Journ. Biol. Chem.,* **122,** 263-273.

4 — Mellon, R. R., Gross, P. e Cooper, F. B. — 1938 — *Sulfanilamide therapy of bacterial infections.* Ed. C. C. Thomas, Springfield, U. S. A.: 61-70.

Vol. 9 — Art. 24 Dezembro de 1938

OBSERVAÇÕES CITOLOGICAS SOBRE O MOSAICO DO FUMO

POR

K. Silberschmidt e J. C. Carvalho

Do Instituto Biologico de S. Paulo

Com 5 figuras no texto

INTRODUÇÃO E HISTORICO

Em continuação do estudo sintomatologico do mosaico do fumo em hospedeiros selvagens no Brasil (10), fizemos algumas observações sobre as inclusões celulares, formadas nessas plantas sob a influencia dessa doença. O fim desse trabalho é apresentar os resultados dessas observações citologicas.

Data de 1903 o primeiro trabalho sobre as inclusões celulares em plantas atacadas de doenças de virus.

Estudando o mosaico do fumo, IWANOWSKI, (8) verificou certas alterações nos componentes das celulas doentes. Comparando tecidos sãos e doentes, notou ele modificações dos cloroplastes e do nucleo, e a presença de tres tipos de inclusões nas celulas dos tecidos doentes:

a) cristais de baixo indice de refração, que em contáto com os acidos se transformam em estrias (agulhas);
b) corpos ameboides que se encontram quasi sempre proximos do nucleo ou em conexão intima com ele e que se assemelham a amébas;
c) inclusões granulares encontradas nas celulas da camada em palissada e que foram tomadas por bacterias.

Os autores posteriores confirmaram a correlação das inclusões do tipo (a) e (b) com as doenças de virus, mas não encontraram ligação intima destas com as inclusões do tipo (c).

A distribuição dessas inclusões (corpos X e corpos estriados) em diferentes especies, foi estudada especialmente por GOLDSTEIN (2) e HOGGAN (6) em plantas da familia das Solanaceas, e por HOGGAN (7) e GRANT (5) em especies de outras familias. GOLDSTEIN (3) verificou a ocorrencia dos dois tipos de inclusões em *Solanum aculeatissimum,* e HOGGAN (6) indicou a existencia dessas inclusões em *Solanum atropurpureum.*

Não podemos reunir aqui as indicações completas da literatura sobre a distribuição de inclusões em todas as especies estudadas até agora; indicaremos apenas os dados da literatura que se referem á

significação dos dois tipos de inclusões. Isso é importante, pois hoje se atribue a esses dois tipos de inclusões outro papel que não lhes foi atribuido pelos primeiros investigadores.

Goldstein (3 e 4), que dedicou a essas inclusões trabalhos muito minuciosos, considera os corpos X como agentes ou como aglomerações desses agentes da doença. Por outro lado, os corpos estriados são considerados por ela, apenas como produtos da reação das celulas de algumas solanaceas em consequencia da presença do virus nessas celulas.

O conceito da significação dessas inclusões mudou-se consideravelmente de uns tempos para cá. Beale (1) indica uma grande semelhança entre as qualidades fisicas e quimicas dos corpos estriados e a proteina obtida por Stanley (10) de plantas atacadas pelo mosaico do fumo. Considerando que essa proteina tem um poder altamente infeccioso, os corpos estriados seriam, não apenas produtos do metabolismo da celula atacada, mas sim fáses muito ativas do proprio virus.

A indicação de uma semelhança entre a proteina obtida por Stanley (10) e os corpos estriados, encontrados nas celulas de plantas doentes de mosaico, estimulou muito, nos ultimos anos, o estudo dessas inclusões cristalinas, ao passo que pouco se fez para esclarecer o papel dos corpos X.

O objetivo do nosso trabalho é estudar alguns pontos ainda não resolvidos pelos investigadores anteriores. Um deles é si a presença dos dois tipos de inclusões depende simplesmente da existencia do virus, ou si elas se formam sómente em plantas que encerrem certa concentração do virus.

Poucos são os trabalhos sobre o assunto, e entre eles encontrámos um de Rawlins & Johnson (9). Esses autores observaram corpos X e corpos estriados, ainda que em pequenas quantidades, em plantas de fumo que haviam sido inoculadas com o virus do mosaico e submetidas a temperaturas nas quais a doença se apresentou numa fórma mascarada. Por outro lado, Beale (1) informa que plantas de fumo inoculadas com uma fórma muito enfraquecida do virus, não apresentam inclusões de corpos X e corpos estriados. Considerando os resultados obtidos por esses investigadores, resolvemos estudar por nossa vez a relação entre o virus e a intensidade dos sintomas.

Com o fim de contribuir para a solução de um outro problema, isto é, a melhor compreensão do papel dos dois tipos de inclusões, reunimos neste trabalho dados sobre a correlação numerica existente entre os corpos estriados e os corpos X, encontrados nos pêlos das folhas. Acreditamos que essas indicações possam auxiliar no estudo

da formação dessas inclusões nas mesmas condições patogenicas e na determinação de condições externas que favoreçam a produção de um só tipo de inclusão. Conhecida que seja uma condição favoravel á formação de um dos tipos de inclusões, mais facil será a compreensão da natureza delas.

Um ultimo objectivo do nosso trabalho é continuar o estudo de plantas da familia das Solanaceas, que são encontradas nas diversas zonas do Estado de S. Paulo, estendendo mais tarde as pesquisas citologicas a outras especies encontradas no país, e que ainda não foram estudadas.

MATERIAL

O material usado foi tirado de folhas de diversas plantas da familia das Solanaceas. De *S. aculeatissimum* tomámos folhas de plantas cultivadas em nosso campo experimental e que foram inoculadas com mosaico do fumo. Além das plantas de *S. aculeatissimum* artificialmente inoculadas, estudámos tambem dois casos de plantas que, sem terem sido inoculadas, apresentavam sintomas de uma clórose. O outro material foi tomado de plantas cultivadas em vasos conservados em caixas protegidas contra insétos. Este estudo tinha por fim verificar si a citologia podia auxiliar a diagnóse das doenças.

As duas especies: *S. aculeatissimum* e *S. atropurpureum*, caracterisavam-se por largas faixas de material verde-claro e uma deformação mais ou menos acentuada da folha. As outras duas: *S. sisymbrifolium* e *S. variabile,* não apresentavam sintomas, apesar de terem sido inoculadas com o mosaico do fumo. Na primeira apareceram áreas verde-claras algum tempo depois da inoculação, mas na época deste trabalho os sintomas já haviam desaparecido. Quanto á segunda especie, não conseguimos provocar sintomas da doença, como aliás já foi mencionado no trabalho precedente (10).

METODOS

Cortámos com uma tesoura esterilizada, pedacinhos de folha sã e doente, em forma retangular de 4 mm. de comprido. Das folhas doentes fizemos separadamente preparações das partes verde-claras e verde-escuras. Esse material foi montado em agua para estudar a existencia dos corpos estriados. Com o fim de observar os corpos X, cortámos do mesmo modo outro material, para ser fixado e examinado conforme o metodo usado por GOLDSTEIN (3): Derramam-se algumas gotas de solução de Schaudinn (*) sobre o material, de modo que este fique inteiramente mergulhado no liquido. Deixa-se assim varios minutos, adicionando-se mais algumas gotas para evitar a cristalisação

(*) Dissolver 5 grs. $HgCl_2$ em 50 cc. de agua distilada e acrescentar á solução 100 cc. de alcool absoluto.

rapida, e quando o material parecer sêco, retiram-se os cristais com algumas gotas de alcool 95º. Lava-se o material com agua e com um papel de filtro tira-se o resto da agua. Deitam-se algumas gotas de uma solução de alumem de ferro a 2 % sobre o metal, assim fica por uns 10 minutos. Lava-se novamente e colora-se com hematoxilina por alguns minutos, descorando-se com uma solução de alumem de ferro a 1 %, si o material ficar fortemente colorido.

RESULTADOS

Reunimos na tabela 1 os resultados obtidos com o material vivo e que se referem á existencia de corpos estriados. Na tabela 2 juntámos os dados sobre a existencia e a frequencia dos corpos X, em material fixado.

As duas tabelas estão organisadas do mesmo modo: a primeira coluna vertical trás o numero total dos córtes estudados; a segunda o numero total de pêlos encontrados. Na terceira coluna da tabela 1 indicamos o numero dos pêlos que contêm corpos estriados, e a mesma coluna da tabela 2 contem o numero de pêlos com corpos X. Finalmente, na ultima coluna, indicámos a porcentagem de pêlos com inclusões, em relação ao numero total dos pêlos estudados.

Das indicações dessas tabelas póde-se tirar a conclusão geral de que o numero dos pêlos com corpos X é bem inferior ao numero dos pêlos com corpos estriados, e que as partes verde-claras contêm mais inclusões do que as verde-escuras. Um outro resultado é que as diver-

TABELA 1

Frequencia de corpos estriados em pêlos de 4 especies de Solanaceas

Material		Córtes	N.º de pêlos	N.º de pêlos com corpos estriados	% de pêlos com inclusões
S. aculeatissimum	Verde-clara . .	12	699	270	38,62
	Verde-escura. .	12	772	33	4,27
	São	8	238	0	0
S. atropurpureum .	Verde-clara . .	10	278	110	39,56
	Verde-escura. .	8	256	22	8,59
	São	10	287	0	0
S. sisymbrifolium .	Inoculado . . .	20	982	43	4,37
	São	20	1.128	0	0
S. variabile. . .	Inoculado . . .	20	340	0	0
	São	20	378	0	0
S. aculeatissimum	pl. 136	8	381	284	74,54
	pl. 159	12	571	46	8,05

TABELA 2
Frequencia de corpos X em pêlos de 4 especies de Solanaceas

Colorido		Córtes	N.º de pêlos	N.º de pêlos com corpos X	% de pêlos com inclusões
S. aculeatissimum	Verde-clara . .	8	1.146	95	8,27
	Verde-escura. .	8	1.249	2	0,16
	São	20	940	0	0
	pl. 136	15	671	53	7,89
	pl. 159	19	701	0	0
S. atropurpureum	Verde-clara . .	20	779	122	15,66
	Verde-escura. .	12	338	3	0,88
	São	20	631	0	0
S. sisymbrifolium	Inoculado . . .	19	1.119	0	0
	São	20	1.132	0	0
S. variabile . .	Inoculado . . .	20	329	0	0
	São	20	373	0	0

sas especies diferem consideravelmente no numero de inclusões. Plantas de *S. variabile,* que continham, conforme experiencias de inoculação, o virus do mosaico do fumo, não mostravam inclusões e nenhuma modificação nas celulas, confrontando-se tecidos de folha sã e inoculada. O material de *S. sisymbrifolium* apresentou apenas um tipo de inclusão (cristais) distribuido numa proporção de 4,37 % nas celulas dos pêlos. Não podemos afirmar si somente o material examinado não apresentava corpos X ou si nesta especie essas inclusões de fato não se formam. Assim, só duas especies estudadas: *S. aculeatissimum* e *S. atropurpureum,* apresentavam dois tipos de inclusões.

Quanto aos resultados detalhados, encontrámos no caso de *S. atropurpureum,* 39,56 % de pêlos com inclusões de corpos estriados e 15,66 % com corpos X, nas areas verde-claras. Nas areas verde-escuras a distribuição é muito menor, sendo 8,59 % para corpos estriados e 0,88 % para corpos X. Para *S. aculeatissimum* temos 38,62 % de pêlos com corpos estriados e 8,27 % com corpos X nas areas verde-claras. Nas partes verde-escuras temos 4,27 % e 0,16 % respetivamente para corpos estriados e corpos X.

Examinando as plantas de *S. aculeatissimum* do campo, não inoculadas, mas que apresentavam uma clórose generalisada, verificámos numa delas, de n.º 136, que 74,54 % dos pêlos continham corpos estriados e 7,89 % apresentavam corpos X. Na planta n.º 159 os pêlos não continham corpos X, mas sim corpos estriados numa quantidade de 8,05 %.

Da planta n.º 136, usámos mais tarde o suco, para inocular folhas sadias de *Nicotiana glutinosa,* e verificámos, de fato, a formação de necróses locais nas folhas inoculadas. Assim, o resultado do exame citologico foi comprovado por estudos de inoculação. Observámos, entretanto, que o suco da planta n.º 159, não produziu necróses em folhas de *N. glutinosa.*

Para facilitar o exame dos dados das tabelas 1 e 2 reunimos, na tabela 3, indicações sobre a relação quantitativa entre os pêlos que continham corpos estriados e os que continham corpos X. Calculamos, para esse fim, o numero dos pêlos com corpos, estriados, que corresponde, em cada uma das 4 especies, a 1 pêlo com corpos X.

TABELA 3

Relação numerica entre os dois tipos de inclusões, encontrados em pêlos de 4 especies de Solanaceas.

S. aculeatissimum	p. verde-clara .	1	pêlo	com	corpos X	para	4,66	com	corpos	estriados
	» » escura	1	»	»	»	»	26,68	»	»	»
	pl. 136	1	»	»	»	»	9,45	»	»	»
	pl. 159	0	»	»	»	»	8,05	»	»	»
S. atropurpureum	p. verde-clara .	1	»	»	»	»	2,52	»	»	»
	» » escura	1	»	»	»	»	9,76	»	»	»
S. sisymbrifolium . . .	(inoculado) . .	0	»	»	»	»	4,37	»	»	»
S. variabile .	(inoculado) . .	0	»	»	»	»	0	»	»	»

Para ilustrar os dados indicados nas nossas tabelas, mostramos na fig. 1 um desenho duma parte da epiderme de folha de planta doente: *S. atropurpureum.* Na epiderme podemos observar alguns dos pêlos multicelulares curvados, caracteristicos da especie. Esses pêlos são constituidos, em geral, de 3 a 5 celulas, que contêm, principalmente as da base, grande numero de cristais de fórma hexagonal. Nesta especie o suco celular tem uma côr rósea, que facilita o reconhecimento dos cristais. Essa coloração torna o estudo das inclusões nesta especie mais facil do que em *S. aculeatissimum,* cujo suco não é colorido. Damos na fig. 2 um desenho dos pêlos desta ultima especie com inclusões. Os tipos de pêlos mais frequentes nessa especie são rétos e compõem-se, como os de *S. atropurpureum,* de 3 a 5 celulas que muitas vezes são muito compridas e contêm um suco não colorido. Ambas as especies possuem, além do tipo de pêlos descritos, pêlos glandulares, que têm uma celula basica e uma celula peduncular, sobre a qual se encontra

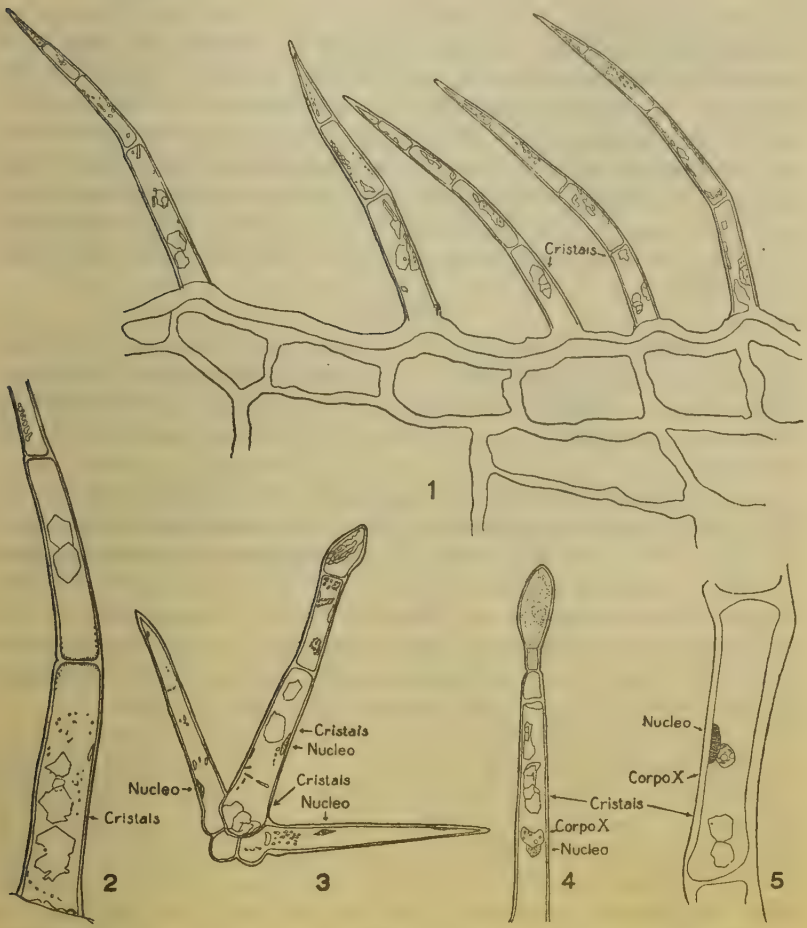


Fig. 1 — Córte superficial da epiderme de folha de *Solanum atropurpureum;* pêlos com corpos estriados. (Ocular 5, objetiva 20 ×). Fig. 2 — Pêlo de *Solanum aculeatissimum,* com inclusões de cristais muito nitidas. (Ocular 5, objetiva 40 ×). Fig. 3 — Pêlo estrelado de *Solanum sisymbrifolium* com fórmas diversas de cristais. (Ocular 5, objetiva de imersão 90 ×). Fig. 4 — Pêlo glandular de *Solanum aculeatissimum* depois da fixação e coloração pelo metodo de Goldstein. O corpo X acha-se na visinhança do nucleo. (Ocular 5, objetiva de imersão 90 ×). Fig. 5 — Celula de pêlo de *Solanum atropurpureum* com os dois typos de inclusões. (Ocular 5, objetiva de imersão 90 ×).

a propria glandula. Alguns pêlos glandulares de *S. atropurpureum* possuem 2 celulas pedunculares. Em *S. sisymbrifolium* notamos poucos pêlos multicelulares simples, mas muitos pêlos estrelados. Além deles,

encontram-se tambem nesta especie, dois tipos de pêlos glandulares, um dos quais tem uma só celula peduncular, enquanto no outro o pedunculo se compõe de duas ou mais celulas. Achamos os cristais principalmente nos pêlos estrelados, fig. 3. As figs. de 1 a 3 são desenhos de pêlos de preparações montadas em agua. Para dar tambem idéia da ocorrencia de corpos X observados em material fixado, mostramos na fig. 4 um pêlo glandular de *S. aculeatissimum,* em cuja base observamos um corpo X e muitos cristais. Apresentamos tambem na fig. 5 uma celula de pêlo multicelular de *S. atropurpureum* com os dois tipos de inclusões.

DISCUSSÃO

Comparando a frequencia das inclusões nas 4 especies estudadas, encontrámos maior numero delas em *S. aculeatissimum* e *S. atropurpureum.* Em *S. sisymbrifolium* observámos quantidade muito menor de inclusões, enquanto em *S. variabile* não notámos nenhum tipo de inclusão.

E' interessante notar a existencia de certa relação entre a quantidade de inclusões e os sintomas que essas 4 especies apresentavam. As folhas de *S. aculeatissimum* e *S. atropurpureum* apresentavam sintomas bem nitidos do mosaico do fumo; em *S. sisymbrifolium* os sintomas só foram observados na primeira fáse da doença, enquanto em *S. variabile* não conseguimos notar sinais dela. A existencia do virus nesta ultima planta foi verificada por meio de experiencias de inoculação em plantas sãs, com suco prensado da planta inoculada.

Talvez não seja fortuita a correlação entre a intensidade dos sintomas e a quantidade de inclusões Os corpos estriados já foram considerados por Beale (1), como inclusões indicadoras da intensidade da doença. Comparando tres tipos de virus do grupo do mosaico do fumo, ela achou que o tipo que havia produzido sintomas mais acentuados, tambem estimulava a formação de maior numero de cristais. Esse resultado foi confirmado por Stanley (12), que não observou cristais em plantas que tinham sido inoculadas com uma amostra fraca de virus do mosaico do fumo. Considerando os nossos resultados e comparando-os com as indicações da literatura, podemos concluir que a formação de tais inclusões não é puramente consequencia da existencia do virus, mas que é preciso certa concentração dele para a formação dessas inclusões. Assim, o exame citologico só póde auxiliar na diagnóse das doenças de virus, nos casos em que os sintomas produzidos são bem acentuados. Esses resultados diminuem o valor do metodo citologico para esse fim.

As observações de Beale (1) e de Stanley (12), sobre a correlação entre a intensidade dos sintomas e a quantidade das inclusões,

referem-se aos corpos estriados, e como os resultados obtidos até agora são mais conclusivos para estes do que para os corpos X, pretendemos continuar esses estudos, examinando especialmente a ocorrencia dos corpos X nas diversas plantas inoculadas com amostras fracas de virus que não produzem sintomas nas plantas infetadas. Esse estudo oferece acentuado interesse, porque os corpos X se encontram distribuidos em um circulo de plantas atacadas com doenças de virus, muito mais vasto do que os corpos estriados.

Por outro lado ha um interesse especial em esclarecer justamente a significação dos corpos X, pois o papel dos corpos estriados, como já foi exposto em outro lugar, já é hoje mais compreensivel, graças aos trabalhos de STANLEY (11), dedicados á purificação de virus. Acreditamos que estendendo os estudos, agora iniciados neste trabalho sobre a correlação numerica dos dois tipos de inclusões, a maior numero de especies, poderemos contribuir para melhor compreensão do papel dos corpos X. Nos trabalhos seguintes pretendemos dar indicações não só do numero dos pêlos com inclusões, como tambem do numero absoluto de inclusões dentro das celulas.

SUMARIO

O fim deste trabalho foi estudar as inclusões em celulas de plantas de 4 especies de Solanaceas atacadas pelo mosaico do fumo.

Em duas dessas especies: *Solanum aculeatissimum* e *Solanum atropurpureum,* foi observado, como já fôra mencionado por outros autores, grande numero de corpos X e corpos estriados. Em *Solanum sisymbrifolium* encontrámos poucos pêlos com corpos estriados, mas não observamos pêlos com corpos X; não conseguimos observar inclusões de qualquer dos tipos nas celulas dos pêlos de *Solanum variabile.*

Como nas duas especies em que as inclusões são mais abundantes, os sintomas da doença são muito acentuados, e nas outras, cujos sintomas quasi não aparecem, as inclusões são pouco numerosas, segue-se que ha certa relação entre a intensidade dos sintomas e a ocorrencia das inclusões. Para esclarecer a natureza dos dois tipos de inclusões começámos com o estudo sobre a relação numerica entre os corpos X e os corpos estriados. Verificámos que em todos os casos o numero dos pêlos que contêm os corpos estriados e maior do que o dos pêlos que encerram corpos X. Nas partes verde-claras de *S. atropurpureum* a relação entre os corpos estriados e corpos X é 2,52 para 1. Nas partes verde-claras de *S. aculeatissimum* a mesma relação é 4,66 para 1.

Discutimos finalmente a significação desses coeficientes e a natureza dos dois tipos de inclusões.

ZYTOLOGISCHE BEOBACHTUNGEN ÜBER DIE MOSAIK-KRANKHEIT DES TABAKS.

Zusammenfassung

Eines der Ziele der vorliegenden Arbeit bestand in der Klärung der Frage, ob sich bei Pflanzenarten, bei denen die Symptome der Viruskrankheiten maskiert sind, die aber zweifellos Virus enthalten, zytologische Zelleinschlüsse nachweisen lassen.

Es wurde daher die Häufigkeit der Einschlüsse — und zwar von X = Körperchen und von kristallisierten Körperchen — bei Haarzellen von Blättern von Solanum aculeatissimum, Solanum atropurpureum, Solanum sisymbrifolium und Solanum variabile — vergleichend verfolgt. Es zeigte sich, dass grosse Mengen von Einschlusskörperchen bei Sol. aculeatissimum und Sol. atropurpureum vorkommen, bei denen die Krankheitssymptome sehr deutlich ausgeprägt sind. Bei der Art Sol. sisymbrifolium, bei der nur sehr leichte Krankheitssymptome festzustellen sind, wurden in unseren Präparaten ausschliesslich gestreifte Körperchen beobachtet und in den Haarzellen von Sol. variabile konnten überhaupt keinerlei Einschlusskörperchen nachgewiesen worden. Diese Beobachtung ist deshalb von Interesse, weil die Symptome der Erkrankung bei Sol. variabile völlig maskiert sind.

Es scheint demnach eine direkte Beziehung zwischen der Prägnanz der Krankheitssymptome und dem Vorkommen von Einschlusskörperchen zu bestehen.

Um die Frage nach dem Wesen der beiden Typen von Einschlusskörperchen zu klären, wurden weiterhin Beobachtungen über das Zahlenverhältnis der Zellen, welche die eine oder die andere Form von Einschlüssen aufweisen, angestellt. Es zeigte sich, dass Zellen mit gestreiften Körperchen häufiger sind als Zellen, welche X = Körperchen enthalten. In den hellgrünen Anteilen von Blättern von Sol. aculeatissimum treffen auf 1 Haarzelle, welche X = Körperchen enthält, 4,66 Zellen, welche gestreifte Körperchen aufweisen. Das entsprechende Verhältnis für Haarzellen der hellgrünen Anteile von Blättern von Sol. atropurpureum beträgt 2,52 :1.

Die Bedeutung der Feststellung dieser Verhältniszahlen und die Beziehungen zwischen Prägnanz der Symptomausprägung und der Zahl der Einschlusskörperchen werden diskutiert.

BIBLIOGRAFIA

1 — Beale, H. P. — 1937 — Relation of Stanley's crystalline tobacco virus protein to intracellular crystalline deposits. *Contrib. of the Boyce Thompson Institute,* 8, 413-431.

2 — Goldstein, B. — 1924 — Cytological study of living cells of tobacco plants affected with mosaic disease. *Bull. Torrey Bot. Club,* 51, 261-273.

3 — Goldstein, B. — 1926 — A cytological study of the leaves and growing points of healthy and mosaic diseased tobacco plants. *Bull. Torrey Bot. Club,* 53, 499-599.

4 — Goldstein, B. — 1927 — The X bodies in the cells of Dahlia plants affected with mosaic disease and dwarf. *Bull. Torrey Bot. Club,* 54, 285-293.

5 — Grant, T. J. — 1934 — The host range and behavior of the ordinary tobacco - mosaic virus. *Phytopath.,* 24, 311-336.

6 — Hoggan, I. A. — 1927 — Cytological studies on virus diseases of *Solanaceous* plants. *Jour. Agr. Res.,* 35, 651-671.

7 — Hoggan, I. A. — 1931 — Further studies on aphid transmission of plant viruses. *Phytopath.,* 21, 199-212.

8 — Iwanowski, D, — 1903 — Über die Mosaikkrankheit der Tabakspflanze. *Zeitsch. Pflanzenk.,* 13, 1-41.

9 — Rawlins, T. E. & Johnson, J. — 1925 — Cytological studies of the mosaic disease of tobacco. *Amer. Jour. of Bot.,* 12, 19-32.

10 — Silberschmidt, K. & Kramer M. — 1938 — Contribuição para o conhecimento do mosaico do fumo e dos seus hospedeiros selvagens no Brasil. *Arq. Inst. Biologico,* São Paulo, 9, 1-20.

11 — Stanley, W. M. — 1936 — Chemical studies on the virus of tobacco mosaic VI. The isolation from diseased turkish tobacco of a crystalline protein possessing the properties of tobacco mosaic virus. *Phytopath.,* 26, 305-320.

12 — Stanley, W. M. — 1937 — A comparative study of some effects of several different viruses on turkish tobacco plants. *Phytopath.,* 27, 1152-1160.

———o———

Vol. 9 — Art. 25 Dezembro de 1938

BRYOZOARIOS PERFURADORES DE CONCHAS

POR

E. Marcus

Do Departamento de Zoologia da Universidade de S. Paulo

Com 7 figuras no texto

A. PARTE GERAL

Na 4.ª parte, dedicada aos *Zoophyta,* do 5.º volume do «Voyage dans l'Amérique méridionale» (1839; 1846) A. D'ORBIGNY descreveu (p. 23) e figurou (t. 10) admiravelmente duas especies novas de Bryozoarios, *Terebripora ramosa* (f. 16, 17) e *T. irregularis* (f. 18, 19) das costas de Arica (Chile) e das ilhas Malvinas, respetivamente. Encontradas dentro da camada calcarea de conchas de *Prosobranchia* da familia *Capulidae (Calyptraea, Crepidula)* e na face interna de *Lamellibranchiata (Pecten),* foram consideradas por D'ORBIGNY como representantes de um novo genero e de nova familia, *Terebriporidae.* Habituado por seus estudos dos fosseis á classificação de estruturas fragmentarias, o paleontologo afamado determinou corretamente como *Bryozoa* o que realmente foram sómente os buracos na concha, os quais outrora tinham sido habitados pelos proprios animais. A nossa figura 2-A dá uma ideia do aspeto da colonia de Bryozoarios perfuradores, não tendo nesta havido nem um unico individuo vivo no momento da fixação. Sendo os buracos e os seus canais conectivos localisados dentro da concha, acham-se pela superficie desta até certo ponto protegidos contra a ação polidora da agua e da areia. Em parte replétos por detrito, Diatomaceas e outras pequenas plantas que se tornam poeira cinzenta ao se secar a concha, os canais enchem-se de ar, o que lhes empresta um brilho prateado.

Embora houvesse aumento do numero das especies determinadas nos anos seguintes á publicação de D'ORBIGNY e se fizesse a descrição do novo genero *Spathipora* com disposição diferente dos buracos em relação com os canais, não se progrediu substancialmente quanto á estrutura desses Bryozoarios. Retrocedeu-se até inicialmente um passo, quando BUSK (1852, p. 29) simplesmente colocou o genero *Terebripora* na sinonimia de *Hippothoa.* Faltando os caracteres anatomicos e sendo compostas as colonias de *Terebripora* por zoécios singulares, o genero logicamente tinha de entrar na familia *Scrupariadae.* Este conjunto hoje emendado (HARMER 1926, p. 197), mas não aceito universalmente (CANU & BASSLER 1929, p. 26), abrangia generos de crescimento uniserial. O arranjo realizado por BUSK, maior autoridade

em Bryozoarios marinhos no seu tempo, não deixou de influenciar FISCHER na sua monografia das *Terebriporidae* (1866). Embora restabelecesse a independencia da familia (p. 342), separando-a das *Scrupariadae* e *Hippothoidae,* conservou a posição dela na visinhança destas familias e colocou as *Terebriporidae* na «classe», como diz, dos *Cheilostomata.* Redescreveu as duas especies de D'ORBIGNY e introduziu 6 novas, recentes, representadas pelos vestigios deixados pelos animais. Além disso tratou de 12 especies fosseis oriundas principalmente de varias camadas terciarias desde o Eoceno, mas tambem jurassicas (Bathoniano e Bajociano, i. é, camadas superior e média do Dogger), havendo mesmo entre as que FISCHER considerou como duvidosas, duas do Liassico inferior e uma do Silurio. Convem citar a observação interessante de FISCHER (1866, p. 311), que em vão procurou *Terebriporidae* em camadas cretaceas, nas quais abundam as esponjas perfuradoras da familia *Clionidae.* As especies recentes descritas por FISCHER provêm da costa sudoeste da França, do mar Mediterraneo, do mar das Antilhas, da costa chilena, do mar Indico e do mar da China. As especies, das quais deixou de publicar figuras, infelizmente são irreconheciveis; em todo o caso provam a vasta distribuição das *Terebriporidae.* Tendo FISCHER encontrado duas das suas especies recentes tambem no Plioceno, o numero total das especies fosseis mencionadas na sua monografia importa em 14, de cuja validade não me compéte julgar. Das 8 especies recentes enumeradas e descritas, sómente *Terebripora ramosa* D'ORB., *T. orbignyana* FISCH. e *Spathipora sertum* FISCH. podemos manter como especies validas.

A descrição do novo genero *Spathipora* (l. c., p. 309 t. 11 f. 4, 4.ª) foi tambem baseada em buracos e canais vazios. Ampliou-se pelo trabalho de FISCHER o numero dos hospedeiros habitados pelos Bryozoarios perfuradores, enumerando ele numerosos caracóis e até *Belemnitidae* habitadas por especie fossil. *Terebripora orbignyana*, tambem mencionada mais tarde em trabalho faunistico de FISCHER (1870), foi descoberta nas ostras da bacia de Arcachon, afamada pela criação de ostras. Podemos confirmar o habitat quanto ás *Terebriporae* do nosso litoral. São elas, porém, inquilinos inocuos para a ostra, cuja concha não destroem com as suas colonias pequeninas. De nenhum modo as *Terebriporidae* pódem ser comparadas com as *Clionidae,* temidas pelos ostreicultores, por boas razões. Não vimos exemplos que possam confirmar a opinião de FISCHER (1866, p. 295), de que as *Terebriporidae* preparam a entrada para perfuradores mais energicos.

A unidade da familia foi dissolvida por EHLERS (1876, p. 123). Juntando-se com BUSK, associou *Terebripora* ás *Scrupariadae* e reuniu *Spathipora* com *Hypophorella,* descoberta por ele, juntamente com

outros generos, no seu grupo dos *Bryozoa stolonifera.* Apezar de Ehlers negar a homogeneidade dos *Ctenostomata,* a sua lista dos *Stolonifera* (p. 127-128) contem, com a unica excepção do genero *Kinetoskias,* sómente generos que realmente pertencem aos *Ctenostomata.* Abre assim caminho para o entendimento corréto das *Terebriporidae.* Entre os proprios bryozoologos, porém, não houve repercussão dessa sistematisação, mostrando-se Hincks inclinado á ideia da identidade de *Hippothoa* e *Terebripora* (1880, p. 286). Jullien (1880), na sua descrição de uma nova *Terebripora* recente, encontrada no orificio de um *Buccinum* das ilhas do Cabo Verde, não discute a posição desses animais no sistema dos Bryozoarios. Tendo Jullien merecimento especial quanto á anatomia dos Bryozoarios, a ausencia das estruturas anatomicas tambem na sua especie nova leva-o á hesitação em considerar *Terebripora* sem reserva como Bryozoario (l. c., p. 143-144). Pensa que talvez seja Hydrozoario. E' muito interessante notar os metodos diferentes do paleontologo d'Orbigny, treinado pela classificação contínua de fragmentos indistintos, e do anatomista Jullien, que fica indeciso ao lhe faltarem os pormenores anatomicos. O catalogo de Jelly (1889, p. 259) separa *Terebripora* de *Hippothoa,* mas visto que não tinha havido sinonimia especifica estabelecida por Busk, essa separação não significa juizo proprio da autora do catalogo das especies. Mostra sómente que considera *Terebripora* como Bryozoario.

Waters (1904, p. 54) deu o passo decisivo e colocou *Terebripora ramosa* d'Orb. na sinonimia de *Hippothoa distans* (P. H. MacGillivray 1868, p. 130), aliás descuidando as regras da nomenclatura (Marcus 1937 *a,* p. 213). Mais interessante que a questão do nome é o motivo apresentado por Hincks e Waters. Da mesma forma, certamente, que Busk, conheceram eles a erosão provocada em conchas por Bryozoarios incrustantes. Quando se afasta do substrato uma parte de tal colonia, afim de pesquisar particularidades de alguns zoécios isolados, vêm-se impressões concavas, ás vezes assás profundas. Dá-se o mesmo em conchas originalmente incrustadas e depois agitadas e polidas pelas ondas em fundos saibrosos. Nomeadamente os vestigios das colonias de zoécios distantes, como ocorrem em varias especies do genero *Hippothoa,* reproduzem nitidamente a configuração dos zoécios e dos tubos conectivos (Fig. 3 B, *h*). A esse fenomeno aludem Hincks e Waters. Querendo preencher a lacuna de se ignorar a anatomia das *Terebriporidae,* recorrem aos seus conhecimentos gerais do grupo. Havendo critica rigorosa, a meu vêr injusta, do trabalho de d'Orbigny sobre os Bryozoarios perfuradores na nota citada de Jullien, a observação da atividade mineira foi despresada e substitui-

da por uma reflexão. E' esta, por si, certa, mas inaplicavel aos buracos e canais dentro da concha, como foram descritos por D'ORBIGNY. Em material de dois mil tubos calcareos de *Ditrupa (Polychaeta, Serpulidae)* NORMAN (1907) encontrou uma vez uma especie nova de *Terebripora,* desprovida tambem da anatomia móle; não discute na publicação respetiva a opinião de WATERS e HINCKS, nem se ocupa da posição da familia no sistema dos *Bryozoa.*

Nas suas monografias sobre os Bryozoarios terciarios da America do Norte (1920; 1923) CANU & BASSLER reestabelecem integralmente a familia e descrevem algumas especies miocenas, pliocenas e pleistocenas dos dois generos. Colocando a familia nos *Ctenostomata,* dizem ficar duvidosa tal posição, enquanto se ignorar a anatomia.

Segundo CANU & BASSLER (1920, p. 842), as *Terebriporidae* não são raras nas costas dos mares atuais; no grande material examinado por minha esposa Exma. Snra. D. EVELINE DU BOIS-REYMOND MARCUS, de conchas provenientes da baía de Santos, achou-se talvez 1 % habitado pelos Bryozoarios. Ocorrem em *Balanus* e varios *Gasteropoda* e *Lamellibranchiata, p. e.* na face externa de caracóis, onde perfuram a camada calcarea, não o periostraco corneo, albuminoide. Observámo-las igualmente na face interna da ultima circunvolução de *Tegula viridula* (Prof. Dr. O. DE FIORE det.). As *Trochidae,* ás quais a especie mencionada pertence, possúem camada interna de madreperola (ANKEL 1936, p. 10) e é notavel a ocorrencia dos Bryozoarios dentro dessa substancia dura (SCHMIDT 1928, p. 134). A camada de madreperola é lisa e densa, não corroida como, frequentemente, a face externa naquelas zonas da concha que perderam o revestimento organico. Ocorrendo na madreperola, as *Terebriporidae* mostram-se perfuradores verdadeiros, não talvez desfrutadores de minimas rachas do substrato. Como em caracóis, habitam tambem em mariscos ambas as faces da concha, interna e externa. Havendo no fundo do mar, é claro, mais conchas vazias que vivas, e oferecendo as primeiras mais pontos acessiveis ás *Terebriporidae,* estas são mais frequentes em conchas mortas. Não podemos, porém, dizer com FISCHER (1866, p. 298) que antes de tudo ocorrem no lado interno. Ainda menos se compreende, a nosso vêr, a opinião de FISCHER (1866, p. 299), de que a ocorrencia de *Terebriporidae* fosseis indica que as conchas perfuradas estavam mortas e tinham sido roladas.

Perfuração ativa das *Terebriporidae* manifesta-se tambem pela habitação de lugares que não poderiam atacar enquanto o molusco ainda está vivo. Assim, encontrámo-las dentro da columela de caracóis quebrados, perto do ápice, portanto, em um ponto que nunca estaria ao alcance da larva durante a vida do caracol. E' muito dura, aliás a cal no

lugar indicado. Colonias da face interna de conchas de mariscos provam igualmente atividade mineira das *Terebriporidae;* embora possa entrar uma ou outra larva do Bryozoario no espaço entre manto e

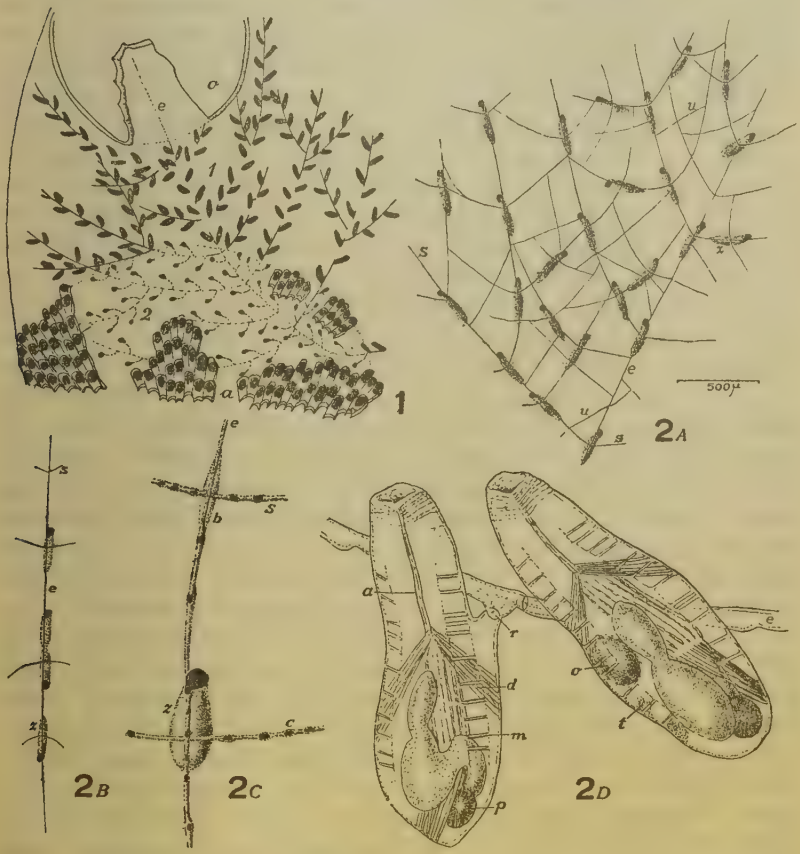


Fig. 1 — *Spathipora sertum* FISCH.; ramos em estados de conservação diferentes na zona exposta ao atrito *(1)* e protegido *(2)* por uma colonia *(a)* de *Acanthodesia tenuis* (DES.), em parte artificialmente afastada; *e*-estolão desprovido de autozoécios lançado pela *Spathipora* debaixo de uma ostra *(o)*, depois de se ter fixado o molusco. Para mostrar o estolão a ostra foi quebrada no respetivo lugar. Fig. 2 *A* — Colonia adulta de *Terebripora ramosa* D'ORB.; *e*-estolão primario; *s*-estolão secundario; *u*-estolões suplementares; *z*-autozoécios. Fig. 2 *B* — Região da ancestrula de *Terebripora ramosa* D'ORB.; para as letras veja fig. 2 *A*. Fig. 2 *C* — Parte do estolão primario *(e)* de *Terebripora ramosa* D'ORB. com autozoécios *(z)*, botão zoécial *(b)*, estolões secundarios *(s)* e póros tubulosos *(c)* de comunicação com a superficie da concha. Fig. 2 *D* — Dois autozoécios de *Terebripora ramosa* D'ORB. no estolão *(e)*; *a*-duplicatura; *d*-musculos da duplicatura (parieto-diafragmaticos); *m*-musculos parietais; *o*-ovo; *p*-proventriculo; *r*-septo (placa em roseta uniporosa ou septula) de inserção; *t*-testiculo.

superficie interior da concha, não haveria aí lugar para se evaginarem os tentaculos, nem alimento para se desenvolver uma colonia.

A posição protegida dos Bryozoarios mineiros tem por consequencia conservarem-se os buracos e canais outrora ocupados pelos autozoécios vivos e estolões respetivamente muito melhor que os vestigios de colonias incrustantes. Por isso foram descritas tantas especies de *Terebriporidae* segundo o tipo do crescimento. Nos *Ctenostomata stolonifera,* aos quais pertencem as *Terebriporidae,* não seria singular ou inconveniente tal classificação no estado atual do sistema. Usam-se em muitos generos do grupo aludido criterios zoariais, i. é, fornecidos pelo tipo de crescimento, da ramificação, etc. Notam-se, porém, nas descrições das *Terebriporidae* caracteres condicionados pelos diferentes estados de conservação. Assim a configuração e o tamanho do orificio depende muitissimo de influencias a que se acham expostas as colonias postmortem. Em uma concha vazia encontramos p. e. uma colonia de *Spathipora* com orificios de bordos polidos e cavidades zoéciais abertas quasi no total do seu comprimento (Fig. 1, *1*). Havia na mesma concha colonisação de *Acanthodesia tenuis* (Des.), cujo zoario (*a*) parcialmente cobria a *Spathipora.* No distrito coberto (2) revelaram-se, quando afastada a *Acanthodesia,* normais os canais e buracos da *Spathipora,* aí protegidos pela *Membraniporida* aludida, contra o atrito e outros fatores do ambiente. Outra parte da concha achava-se ocupada por uma pequena ostra (*o*). Esta tinha se fixado nesse lugar antes de ter a *Spathipora* crescido até ali. Em extensão de 2 mms. o estolão do Bryozoario tinha avançado debaixo da ostra, sem lançar, porém, botões. Por fóra da ostra a colonia tinha-se adiantado, crescendo em redor desse obstaculo. Ocorrendo em outros casos estolões de comprimento igual carecentes de zoécios, o tecido estolonial é possivelmente capaz de conduzir as substancias alimenticias do ultimo zoécio nutridor á distancia de 2 mms. Tendo falhado o crescimento ulterior do estolão debaixo da ostra, deve-se isso verosimilmente á impossibilidade de se comunicar o tecido crescente com o oxigenio da agua. Talvez seja até indispensavel tal contato para poder realizar-se a ação perfuradora.

Ignora-se o procedimento mineiro das *Terebriporidae.* Em oposição á *Hypophorella expansa,* que vive em tubos de *Polychaeta (Lanice, Chaetopterus)* e por meio de uma lima quitinica impede o fechamento dos seus orificios pela secreção quitinoide dos vermes, não se vêm estruturas morfologicas nos individuos de *Terebripora* combinaveis com função mecanica. Temos de supôr que o tecido da zona de gemação atúe sobre a cal da concha, quer meramente por fagocitose, quer em combinação com dioxido de carbono, resultante da respiração.

Tal tecido, de divisão e metabolismo intensos, encontra-se na ponta do estolão, nas suas dilatações dirigidas para a superficie da concha (Fig. 6 D, *t*) e nos pontos onde se originam botões. Excéto os *Gephyrea* e *Polychaeta,* cuja raspagem mecanica e dissolução quimica da cal se acham descritas no trabalho muito rico em fatos e notas bibliograficas de Lamy e André (1936), não é facil compilar os dados sobre os organismos perfuradores. Pelo que posso julgar depois de uma inspeção, em verdade um tanto superficial, falta mesmo, em certos casos, a prova exata de atacarem os animais encontrados em conchas os esqueletos mortos. Sem tal verificação, não fica excluida a possibilidade teorica de tratar-se, inicialmente, nos organismos respetivos, de uma fixação sobre a concha. Continuando o molusco a secreção da cal, tal animal fixado poderia chegar a ser parcialmente incluido sem nenhuma atividade mineira. Em colonias vivas de Bryozoarios calcareos, sobre as quais se fixam Hydrozoarios, continúa ás vezes tão intensamente a calcificação, que as hidrorizas chegam a ser enterradas nas paredes frontais dos Bryozoarios (Hastings 1930, p. 558; Harmer 1934, p. 530).

Foram observadas algas *(Chlorophyceae)* e cogumelos em conchas de *Pulmonata* terrestres, p. e. nas de *Clausilia* (Geitler 1935), *Cyanophyceae* e outros microorganismos, talvez *Myxomycetes,* na casca, nos espinhos e nas pedicelarias de ouriços e estrelas do mar (Mortensen 1910; 1933, p. 470; 1934), até com efeito letal para o hospedeiro. Ignora-se a maneira por que destroem a cal, mas é claro que tem que ser quimicamente pelos processos respiratorios, segundo uma informação do meu prezado colega Prof. Dr. K. Arens (Rio de Janeiro). Nada se sabe de como a larva das *Clionidae (Porifera)* penetra dentro da concha (Hentschel 1923-25, p. 372); a perfuração ulterior da esponja adulta processa-se verosimilmente por fagocitose das particulas calcareas por certas celulas. (Fredericq 1924, p. 3; Arndt 1928, p. 37). Essa fagocitose, porém, não se acha perfeitamente esclarecida, dando-se o mesmo com os osteoclastos nos mamiferos e no homem (Levi 1935, p. 473). Ankel admite (1936, p. 129) que será futuramente encontrada explicação conjunta, tanto da resorpção parcial da propria concha, que se verifica nos caracóis, quanto da atividade perfuradora observada em varias especies destes animais. Até hoje a perfuração praticada por muitos moluscos não póde ser explicada uniformemente. Na classe dos *Gasteropoda* ficou isolada a descoberta do conchiliologista Troschel (1854), de acido sulfurico em *Dolium,* «caramujo cujo jacto de saliva faz espumar os palacios de marmore de Veneza», como disse Émile du Bois-Reymond na sua linguagem exornativa. Nas *Naticidae* e *Muricidae* não foi verificada secreção acida, sendo assim provavel-

mente mecanico o seu modo de perfurar. Segundo a ultima compilação das observações concernentes aos *Lamellibranchiata* (Haas 1926, p. 66) *Lithodomus* e *Petricola* perfurariam as conchas por meio de secreção acida; mas, visto que perfuram tambem pedras não calcareas, o problema não se acha resolvido. O ultimo trabalho sobre os mariscos corrosivos que conheço (Kühnelt 1930) considera a atividade perfuradora de *Lithodomus lithophagus* (L.) como caso especial da capacidade de resorpção da cal em determinadas regiões da propria concha, dissolvendo e resorvendo verosimilmente as granulosas celulas acidofilas do manto e da face externa dos sifões tambem a cal do ambiente. Ultrapassaria o limite do breve relatorio comparativo dos animais perfuradores visado por mim, se eu entrasse pormenorisadamente no complexo assunto dos mariscos corrosivos. *Pholas* trabalha mecanicamente, funcionando os dentes da concha á maneira de uma raspadeira. Sobre os ouriços do mar encontrei sómente algumas indicações na literatura geral; segundo estas, seriam perfuradores mecanicos, cavando os seus buracos ás vezes muito profundos na cal dos recifes, no granito e em lavas vulcanicas, por meio dos dentes da «lanterna», e em certos casos com os espinhos (Brehm 1918, p. 367, 368-369; Cori 1928, p. 87). Não é crivel que isso seja a ultima palavra quanto á atividade cavadora dos ouriços do mar, merecendo talvez atenção especial o estudo do feldspato dos buracos excavados no granito. Quanto á perfuração dos *Abdominalia (Cirripedia)* e *Phoronidea,* nada se sabe (Broch 1926-27, p. 534; Cori 1932, p. 105).

Lembrando o esqueleto dos *Acantharia (Radiolaria),* que consiste em sulfato de strontio, o quilate de 2-3 % e mais, de iodo, no esqueleto dos *Antipatharia (Anthozoa),* enquanto a agua ambiente contem 0,002 %, a quantidade de bromo na secreção da *Purpura,* o vanadio que forma a parte essencial da materia corante do sangue dos *Tunicata,* compreende-se a dificuldade de analisar as varias especifidades da capacidade absorvente das celulas dos varios animais. Ray Lankester disse que em animais capazes de formar deposito calcareo em forma de concha, osso ou produção semelhante, o tecido é tambem capás de resorpção da cal (Lamy & André 1936, p. 959 nota). Um exemplo desse tipo fornecem os caracóis perfuradores terrestres (Kühnelt 1932), nomeadamente os da familia *Helicidae,* que dissolvem o carbonato do calcio de pedras por meio do gaz carbonico respiratorio contido no muco da superficie do corpo, resorvendo a cal dissolvida. A respiração cutanea pode atingir em certos *Pulmonata,* a saber nas lesmas do genero *Limax,* até 57 % da respiração total. O

primeiro passo para esclarecer a ação perfuradora das *Terebriporidae* deveria portanto ser a pesquisa da formação do esqueleto nos Bryozoarios calcareos.

B. PARTE SISTEMATICA

Familia *Terebriporidae* d'Orbigny, 1839.

Bryozoa Ctenostomata stolonifera que perfuram superficialmente as camadas calcareas de conchas. Os estolões ramificam-se todos no mesmo plano horizontal e emitem projeções para cima, perfuradoras da camada superficial da concha. Os autozoécios acham-se dispostos isoladamente: não são agrupados.

Genus *Terebripora* d'Orbigny, 1839.

As colonias são irregularmente reticuladas por se desenvolverem entre os estolões providos de autozoécios, estolões conectivos, sem autozoécios. Estes ultimos são colocados de tal maneira que a direção longitudinal deles é aproximadamente paralela ao estolão, aparecendo sómente os orificios dos autozoécios em um ou outro lado do estolão, mas sempre bem perto dele.

Genotipo: *Terebripora ramosa* d'Orbigny (1839, p. 23).

Genus *Spathipora* Fischer, 1866.

As colonias são ramificadas, mas não reticuladas, visto não serem ligados os estolões providos de autozoécios por estolões conectivos. Os autozoécios são dispostos nos dois lados do estolão, de modo a divergir a direção longitudinal deles anguladamente do estolão.

Genotipo: *Spathipora sertum* Fischer (1866, p. 309).

Especies recentes do genero Terebripora:

Terebripora ramosa d'Orb. (Fig. 2 A-D).

Terebripora ramosa d'Orbigny, 1839; 1846, p. 23; t. 10 f. 16, 17.
Terebripora ramosa Fischer, 1866, p. 299 t. 11 f. 1, 1a.

A colonia começa com o estolão primario (*e*), no qual se formam autozoécios (*z*) em distancias de 500-650 μ. Sómente na região da ancestrula (Fig. 2 B) ocorrem, pelo menos no material presente, dois autozoécios juntos e com orificios opostos, de maneira que o estolão primario em rigor, consiste em dois estolões que crescem em direções contrarias. Não havendo em nenhum dos dois primeiros zoécios caracter morfologico que distinguisse um ou outro dos restantes, não é possivel marcar a ancestrula verdadeira na colonia adulta. Indicaria talvez a ausencia de estolões secundarios, transversais no caso figurado, aquele autozoécio que representa a ancestrula; mas o material disponivel

da região ancestrular é demasiadamente pequeno para permitir verificação definitiva.

Perto dos pontos nos quais brotam os autozoécios, originam-se no estolão primario os estolões secundarios (Fig. 2 A, B, *s*), que se dirigem para dois lados opostos. Formam um angulo de 45-90º com o estolão primario. Distanciando-se os autozoécios tão consideravelmente nos estolões secundarios, como no estolão primario, não se efetua em *Terebripora* colonização intensa, realizada em *Farrella repens* (Marcus 1926, p. 25-28) pelos estolões secundarios. O estolão secundario em formação (Fig. 2 B, C, *s*) e os estolões suplementares (Fig. 2 A, *u*) a serem discutidos no seguinte, mostram que o primordio do kenozoécio estolonial precede ao autozoécial, assinalando Brien e Huysman (1937, p. 14 etc.) crescimento identico em *Bowerbankia pustulosa* (Ell. Sol.). Devemos, é claro, excetuar nisso o começo do crescimento da colonia, pois em todos os Bryozoarios providos de estolões, um ou dois autozoécios iniciais procuram o material necessario para o crescimento estolonial e os botões dos autozoécios seguintes.

Os estolões suplementares (Fig. 2 A, *u*), cuja sucessão não é demonstravel na colonia adulta, carecem de autozoécios. A' medida que progride a idade da colonia, tornam-se mais numerosos os estolões suplementares, até se formar, afinal, uma rede de malhas irregulares. Incumbindo as funções de alimentação e de reprodução sexual, como sempre nos Bryozoarios, aos autozoécios e achando-se suprimida nos estolões suplementares a gemação de autozoécios, aliás presente em *Ctenostomata* estoloniferos de crescimento semelhante, a significação biologica dos estolões suplementares tem de ser outra. E' de crer que seja respiratoria, em virtude de se comunicarem todos os estolões com a superficie livre da concha.

Os estolões lançam, com intervalos irregulares, pequenos tubos para cima, os quais na colonia figurada, morta, (Fig. 2 C, *c*) aparecem como buraquinhos. Embora falte o revestimento quitinico destes tubos, encontrado por nós sómente em *Spathipora sertum* (Fig. 6 D, *t*), temos por seguro que concordam por principio as comunicações com a superficie nos dois generos. Não raras vezes os buraquinhos faltam completamente no nosso material, porque a concha respetiva tinha sido polida. Em tais casos não ha mais buraquinhos nem tubos estoloniais fechados, mas sim sulcos abertos, uniformes. As cavidades dos zoécios conservam-se, em parte, por estarem colocadas mais profundamente. A região orificial, porém, outrora em contáto com a superficie original da concha, acha-se mais ou menos raspada, assumindo a abertura zoécial configurações variadas. Não se vê mais o orificio arredondado, mas uma fenda em forma de virgula, mais larga superficialmente, onde foi

mais eficaz o atrito, estreitando-se para baixo. Ao fundo, subsiste um saquinho, o resto da cavidade ocupada pelo autozoécio. Compreender-se-á sem descrição pormenorizada que quasi cada colonia da mesma especie poderia oferecer aspéto diferente segundo a maior ou menor intensidade do atrito a que tivesse sido sujeita, o qual ainda poderia atacar de maneira diferente nos varios pontos da concha diversamente expostos. Torna-se porisso precaria a distinção de especies fosseis, talvez irregularmente polidas. Assim nem mesmo sempre será possivel formar o conceito da disposição mais densa ou mais distante dos autozoécios, caso não seja bastante grande a colonia para permitir avaliar-se o termo medio das distancias. Não conheço outros Bryozoarios, nos quais com um só exemplar se podessem distinguir especies diferentes com tanta facilidade, particularmente em material fossil.

Tambem em material recente, mas morto, o contorno do orificio zoécial acha-se condicionado pelo fato de quebrar-se um pedacinho da superficie da concha. Entre a linha que foi cavada pelo estolão e o buraco efetuado pelo proprio orificio, estala a chapinha delgada da cal da concha, dando assim origem a um seio («rimula», «sinus» da literatura sistematica), sem paralelo nenhum nos *Ctenostomata* e incompativel com o orificio do cistidio quitinico intacto (confira Fig. 2 C com 2 D). Foi esse seio que levou muitos autores como FISCHER (1866, p. 297), á ideia de relações entre *Terebriporidae* e *Hippothoidae*. A configuração do orificio quadrangular do cistidio concorda com a de muitos outros *Ctenostomata*. A anatomia dos animais (Fig. 2 D) confirma terminantemente que pertencem aos *Bryozoa Ctenostomata*, mas a analise pormenorisada não revela estruturas singulares. A maneira de inserirem os autozoécios com a sua região média ou mesmo superior no estolão, proporciona-lhes colocação aprofundada, apezar de se encontrar o proprio estolão coberto sómente por ca. de 10 μ de cal, sendo ele assim colocado na camada mais superficial da concha. Condições de assimetria semelhante, embora muito menos pronunciada, encontram-se no genero *Hypophorella* (EHLERS 1876, p. 24), cuja unica especie até agora conhecida mina nos tubos quitinicos de *Polychaeta*. Convem lembrar que na familia *Buskiidae*, de parentesco proximo com as *Terebriporidae*, *Buskia nitens* (HARMER 1915, p. 86; MARCUS 1938, p. 59) e *Buskia socialis* (MARCUS 1937, p. 143) tambem não inserem com a ponta proximal do cistidio, mas no meio da parte adnata, portanto excentricamente. Crescendo as duas especies de *Buskia* superficialmente, a inserção excentrica não poderia ser correlatada com a atividade mineira nas *Terebriporidae*. No genotipo do segundo genero desta familia, em *Spathipora sertum*, é muito menos excentrica a inserção dos zoécios no estolão que em *Terebripora*. A

posição obliqua, quasi horizontal dos autozoécios de *Spathipora sertum* torna-lhes possivel ficarem abrigados na cal da concha. Na inserção de *Terebripora ramosa* existe um septo uniporoso (Fig. 2 D, *r*), havendo iguais entre os kenozoécios componentes do estolão.

Dos orgãos do polipidio, que em nada se distinguem dos que comumente ocorrem nos *Ctenostomata* restantes, seja mencionado apenas o proventriculo (*p*), dilatação globosa de parede musculosa do tubo digestivo entre esofago e estomago. Carecendo de interno revestimento quitinico, não é proventriculo tipico no sentido do chamado «gizzard» da literatura, mas corresponde ao proventriculo existente nos generos *Nolella* e *Victorella*. A duplicatura (Fig. 2 D, *a*) é comprida; o numero dos tentaculos importa em ca. de 12. Em tres individuos foi encontrado um unico ovo (*o*) com maior diametro de ca. de 70 μ. A distancia entre os orificios dos autozoécios sucessivos no mesmo estolão importa, em média, em 500-650 μ; o comprimento dos autozoécios, em 300 μ; a largura deles, em 80 μ; o diametro do estolão, em 10-15 μ. Quanto á lamina dos autozoécios descalcificados (fig. 2 D), a distancia entre os autozoécios aí não é tipica, porque os cistidios desprovidos do apoio efetuado pelo ambiente calcareo normal não ficaram na posição originaria.

Baía de Santos, em varias profundidades de 0-20 m.

Distribuição geografica: Costa setentrional chilena, Arica, sem indicação batimetrica.

Terebripora orbignyana Fisch. (Figs. 3A, 3B, *t*).

Terebripora orbignyana Fischer, 1866, p. 298, 301 t. 11 f. 2, 2a.

Os estolões desta especie muito tenue ramificam-se parca e assimetricamente, dando-se tal irregularidade nomeadamente pela frequente falta unilateral de estolões secundarios. Os estolões secundarios não raramente partem do estolão primario em ponto muito distante dos autozoécios. Onde ha autozoécio perto da saída lateral de estolões, esta acha-se situada distalmente do autozoécio proximo e em distancia de 40-50 μ dele. A configuração quasi côniforme dos autozoécios, assinalada pelo autor da especie, resulta da posição ingreme deles, tornando-se assim indistinto o contorno do fundo proximal dos zoécios. Em correlação com a sua posição aproximadamente vertical á superficie da concha, o autozoécio acha-se desprovido de tubulos de comunicação com a superficie, havendo-os, embora pouco numerosos, nos estolões. A largura do orificio zoécial importa em 50 μ; o comprimento do buraco deixado pelo zoécio é visivel até 90 μ de profundidade. O diametro dos estolões importa em ca. de 13 μ; a distancia entre autozoécios sucessivos, em 500-800 μ.

Na face interna de uma concha da familia *Fissurellidae* da baía de Santos foi encontrada a especie figurada, que corresponde muito bem á diagnose original de *T. orbignyana*. Na descrição atualmente apresentada nada está em contradição com a publicada 72 anos mais

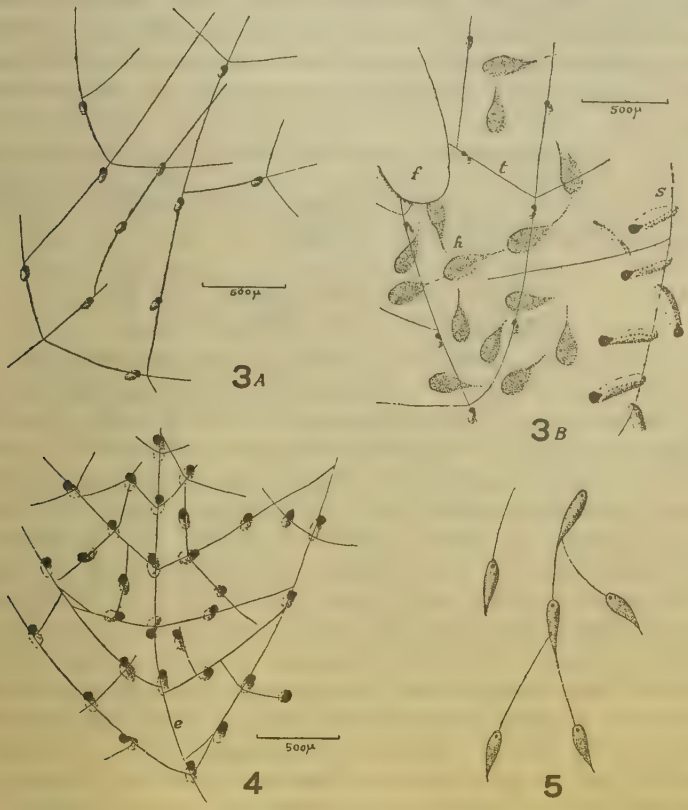


Fig. 3 *A* — *Terebripora orbignyana* FISCH.; colonia jovem. Fig. 3 *B* — Conjunto de *Terebripora orbignyana* FISCH. *(t)*, *Spathipora sertum* FISCH. *(s)* e uma especie erosiva, talvez *Hippothoa divaricata* LMX. *(h)* na face interna de uma concha (Familia: *Fissurellidae)*, perto da fenda anal *(f)*. Fig. 4 — *Terebripora fischeri* JULL.; parte de uma colonia com estolão primario *(e)* e ramificação assás regular para os dois lados dele. Fig. 5 — *Terebripora irregularis* D'ORB.; segundo D'ORBIGNY (1846, t. 10 f. 19).

cedo, excéto a retificação quanto á indicação do ponto da saída dos estolões em relação com os autozoécios. Na colonia jovem aqui presente são raros os estolões suplementares, que formam rede assás densa no material de FISCHER. E' de grande valor para a integridade da rese-

nha atual das *Terebriporidae* ter minha esposa, Exma. Snra. D. EVELINE DU BOIS-REYMOND MARCUS, descoberto a colonia meúda (Fig. 3 B, *t*) na concha aludida, onde cresceu junto com outra especie mineira, *Spathipora sertum* FISCH. (Fig. 3 B, *s*), e outra erosiva (*h*). E' impossivel formar juizo certo sobre esta ultima colonia, visto tratar-se, nos vestigios superficiais deixados por ela, de contornos um tanto indistintos. Pelas medidas e pelo tipo de ramificação pensar-se-ia em *Hippothoa divaricata* LMX., especie até agora não verificada por nós na baía de Santos.

Baía de Santos em concha da fam. *Fissurellidae,* lançada á praia.

Distribuição geografica: Costas sudoeste e mediterranea da França, sem indicação batimetrica.

Terebripora fischeri JULL. (Fig. 4).

Terebripora fischeri JULLIEN, 1880, p. 142 f. 1-3.

A especie, de ramificação bastante regular, concorda com *T. ramosa* por saírem os estolões secundarios do estolão primario aos pares e em direção oposta. Sendo sobreposto o ponto de saída destes estolões aproximadamente ao meio dos autozoécios, dá-se outra particularidade importante de concordancia entre *T. ramosa* e *fischeri,* enquanto os ramos laterais do estolão de *T. orbignyana,* ás vezes pares, outras vezes não, partem em certa distancia distalmente dos autozoécios ou muito longe deles. A distancia entre os autozoécios de *T. fischeri* importa em ca. de 300 μ, sendo assim bem menor que em *T. ramosa.* Mais importante ainda parece, pelo menos nas colonias aqui em mão, e identificadas com *T. fischeri,* a diferença quanto á posição dos autozoécios. E' esta assás ingreme, ás vezes quasi perpendicular ou muito obliquamente afundada em *T. fischeri,* mais superficial, portanto menos obliqua em *T. ramosa.* Aparecem assim mais curtos os zoécios de *T. fischeri,* que se aproxima deste modo ao aspéto de *T. orbignyana.* O habito geral das colonias de *T. ramosa* e *T. fischeri* aqui em mão é algo diferente, por partirem, frequentemente, na ultima especie, os estolões secundarios e suplementares, do estolão primario e dos secundarios, respetivamente em angulos agudos, em vez de quasi rétos, como muitas vezes em *T. ramosa.* Vêm-se bem no nosso material os póros na parede frontal zoécial, que são os vestigios de pequenas dilatações canaliformes lançadas pelos cistidios para se comunicarem com a superficie da concha. Nos zoécios menos obliquamente situados da descrição original, faltam os póros correspondentes nos zoécios; são, porém, nitidos nos estolões. Entretanto, não pudemos verifica-los nos estolões das nossas colonias.

Se fôr correta a interpretação acima aludida (veja p. 284) de que a forma conica do fundo proximal dos autozoécios de *T. orbignyana* indicaria posição muito obliqua deles, o material santista, determinado como *T. fischeri,* parecer-se-ia, a esse respeito, mais com *T. orbignyana* do que com *T. fischeri* da diagnose original, cujas figuras revelam posição bem mais horizontal dos zoécios. Considerando, porém, como possivel que haja certa variação da posição dos zoécios em conformidade talvez com a maior ou menor duresa das camadas calcareas, preferimos atribuir importancia principal aos caracteres zoariais, nos quais o material aqui em mão concorda perfeitamente com *T. fischeri* no sentido de JULLIEN. Não se póde concluir, é verdade, a possibilidade de se tratar em *T. orbignyana* e *T. fischeri,* de uma só especie; mas a figura de FISCHER não permitiria atualmente estabelecer tal sinonimia, sendo, além disso, a posição ingreme dos autozoécios de *T. orbignyana* sómente uma dedução teorica.

Baía de Santos em ca. de 20 m. de profundidade.

Distribuição geografica: Ilhas do Cabo Verde, sem indicação batimetrica.

TEREBRIPORA - SPECIES INCERTAE SEDIS.

Terebripora irregularis D'ORB. (Fig. 5).

Terebripora irregularis D'ORBIGNY, 1839; 1846, p. 25; t. 10 f. 18, 19.
Terebripora irregularis FISCHER, 1866, p. 299.

A colonia forma uma rede irregular; os autozoécios são espaçosos e os estolões muito finos, quasi invisiveis. A distancia entre os autozoécios importa no quintuplo e até sextuplo do comprimento deles. O estolão primario e os estolões secundarios são retilineos; os suplementares são irregulares, divergindo para todos os lados, de modo que formam linhas enredadas.

Distribuição geografica: Ilhas Malvinas, na face interna da concha de um *Pecten* rolado, sem indicação batimetrica.

Terebripora antillarum FISCH.

Terebripora antillarum FISCHER, 1866, p. 300.

A colonia muito ramosa cobre grandes superficies. Dos estolões principais retilineos ou obliquos, ás vezes ligeiramente encurvados, sáem os secundarios com angulos diversos, tanto quasi rétos, quanto de 45 gráos. Os autozoécios acham-se dispostos distalmente do ponto de ramificação; são curtos e inclinados para a direita ou esquerda do estolão, no qual inserem. A distancia entre os autozoécios importa no triplo do seu comprimento.

Na diagnose foi omitida uma parte relativa aos estolões, evidentemente insignificante como caracter especifico. A relação topografica entre os pontos de saída dos estolões laterais e os autozoécios foi interpretada do mesmo modo como em *T. orbignyana* (v. p. 284).

A posição generica da especie parece duvidosa.

Distribuição geografica: Mar das Antilhas, em *Strombus, Fasciolaria* e outras conchas; sem indicação batimetrica.

Terebripora pusilla Fisch.

Terebripora pusilla Fischer, 1866, p. 300.

A colonia, muito pequena, forma um conjunto radiado, mas muito irregular. A distancia entre os autozoécios é muito grande. Os estolões principais são retilineos ou encurvados, os laterais são curtos.

Distribuição geografica: Mar da China, em *Pectinidae,* sem indicação batimetrica.

Terebripora reticulum Fisch.

Terebripora reticulum Fischer, 1866, p 301.

A colonia, reticulada e intricada, estende-se largamente na superficie das conchas, havendo muito frequentemente comunicações anastomoticas entre os estolões. Os autozoécios são curtos, conicos e largos, saíndo os estolões laterais proximalmente dos autozoécios ao nivel dos fundos zoéciais. Nos estolões muito desligados acham-se dispostos os autozoécios em distancias que importam no septuplo e até no octuplo do comprimento deles.

Distribuição geografica: Oceano Indico, em *Septifer,* sem indicação batimetrica.

Especies recentes do genero Spathipora

Spathipora sertum Fisch. (Fig. 1, 3 B, *s,* 6 A-D)

Spathipora sertum Fischer, 1866, p. 309 t. 11 f. 4, 4a.

Nas colonias predominam os estolões retilineos, embora haja tambem incurvados, como p. e. o estolão primario (e) da figura 6 A. A saída dos estolões secundarios dá-se em angulos de quasi 50-90°, havendo colonias, como a da figura original e da nossa 6 A, cada vez sómente com um estolão secundario nos pontos de ramificação, e outras (Fig. 6 B) com dois estolões secundarios opostos. A nosso vêr, essa diferença não justificaria separação especifica dos dois tipos, a não ser que seja futuramente verificada como caracter constante. Nos estolões oriundos dos secundarios, que poderiam ser denominados terciarios, ocorrem autozoécios, de modo que faltam os estolões desprovidos de zoécios que produzem as anastomoses reticuladas de *Terebripora ramosa, orbignyana* e *fischeri.* Em *Spathipora* não se fundem os estolões nas pontas livres, mesmo quando se cruzam, como á direita, por cima, na figura 6 A. Como se vê pelo septo (*s*) na figura 6 D, as ramificações efetuam-se na ponta distal do kenozoécio estolonial, formando-se o septo uniporoso imediatamente atrás (distalmente) da saída do estolão lateral. Ha septo igual no ponto de origem deste estolão, assim como nas inserções dos autozoécios, cujos sócos tubuliformes são um tanto mais compridos que os tubulos estoloniais que se comunicam com a superficie.

Estes tubulos (Fig. 6 D, *t*) pudemos verificar em intervalos irregulares ao longo dos kenozoécios estoloniais e na face frontal dos

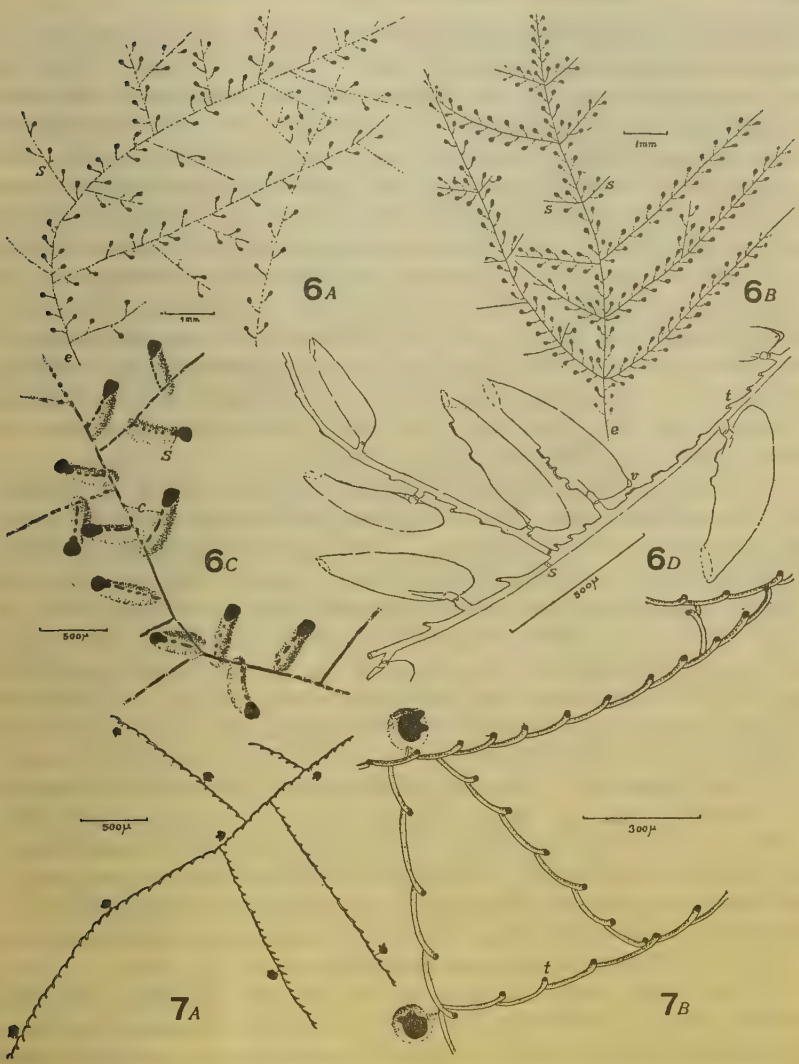


Fig. 6 *A* — *Spathipora sertum* FISCH.; colonia com cada vez um estolão secundario *(s)* nos pontos de ramificação do estolão primario *(e)*. Fig. 6 *B* — *Eadem;* colonia com dois estolões secundarios *(s)* opostos nos pontos de ramificação do estolão primario *(e)*. Fig. 6 *C* — *Eadem;* vestigios deixados por uma colonia na cal de uma concha; *c*-canaliculos de comunicação nos estolões e autozoécios. *s*-seio no bordo proximal do orificio zoécial. Fig. 6 *D* — *Eadem;* cuticula chitinica de estolões e autozoécios; *s*-septos entre os kenozoécios estolonias e na inserção dos autozoécios; *t*-tubulos lançados pelos estolões e autozoécios para a superficie da concha; *v*-verruguinha na ponta proximal do autozoécio. Fig. 7 *A* — *Spathipora ditrupae* (NORM.); aspecto da colonia. Fig. 7 *B* — *Eadem;* inserção dos autozoécios no estolão e tubulos estoloniaes *(t)*.

autozoécios, cujos cistidios se tinham conservado em um caso das numerosas colonias vistas por nós. Tendo resistido a cuticula quitinica da parede do corpo, tanto no estolão como em grande parte dos autozoécios, torna-se possivel proporcionar o aspeto da colonia isolada por descalcificação (Fig. 6 D) com o dos vestigios (Fig. 6 C) deixados pela colonia na concha, onde aparecem como canais parcialmente interruptos e tubos unilateralmente porosos. Ignora-se a configuração verdadeira do orificio, por faltarem as margens superiores dos cistidios (Fig. 6 D), e os buracos deixados na superficie da concha (Fig. 6 C) mostrarem contornos variados, conforme as deformações postmortais (veja tambem pg. 277, Fig. 1). O talho comprido do autozoécio da figura original (FISCHER 1866, t. 11, fig. 4 a) efetuou-se por atrito da concha e não representa senão os póros superficiais confluidos entre si e com o seio, sem duvida artificial, que se vê no meio do bordo inferior de varios autozoécios da Figura 6 C.

A posição dos autozoécios em relação com o estolão foi descrita na diagnose do genero (p. 281); a inserção deles é excentrica, como em *Terebripora ramosa,* dando-se, porém, muito mais perto do fundo proximal, onde ás vezes ha uma verruguinha cuticular (Fig. 6 D, *v*), semelhante á correspondente de *Hypophorella expansa* (EHLERS 1876, p. 24). Pela posição quasi horizontal dos autozoécios dentro da concha, torna-se possivel ficarem eles, apezar da sua inserção proximal, ao abrigo da cal do hospedeiro. Além disso acham-se os estolões de *Spathipora sertum* situados mais profundamente na concha que os de *Terebripora ramosa,* a saber, em distancia de ca. de 25-30 μ da superficie, contra 10 μ em *T. ramosa.* A distancia variavel entre os autozoécios importa em média, em ca. de 200 μ ou mais, sendo eles situados alternadamente nos dois lados do estolão; os sucessivos no mesmo lado distam, em média, 400 μ e mais; o diametro do estolão importa em 30 μ, a altura (o comprimento) dos zoécios em 450-550 μ, o diametro (a largura) deles, em 120-170 μ, os tubulos de comunicação com a superficie medem no estolão 30 μ; nos autozoécios, 20-25 μ.

A especie, cujo nome (*«sertum»* = festão, grinalda, corôa de flores) adequadamente indica o aspéto total das colonias, é a mais conhecida dentro da familia, embora faltem ainda os polipidios. Não convem, a nosso vêr, na primeira monografia das especies recentes da familia desde 1866, refundir completamente o sistema dela, porque primeiramente é mister legitimar a familia como pertencente aos *Bryozoarios Ctenostomata* e chamar a atenção dos zoologos para ela. Quem confrontar a diagnose do genero *Spathipora* como foi dada aqui (v. p. 281), com a de FISCHER (1866, p. 308), verificará que a nossa é muito mais curta e um tanto artificial. Foi inevitavel isso, visto que

se manifestaram muitos caracteres indicados por FISCHER, ora ausentes no nosso material de *Spathipora,* ora presentes tambem em *Terebripora.* São dois caracteres aproveitaveis para as diagnoses genericas, um zoecial e um zoarial. O primeiro é oferecido pelo tipo de inserção dos autozoécios nos kenozoécios estoloniais. O segundo refere-se ao desenvolvimento, ás vezes rico, de estolões suplementares, que podem tornar reticulada a colonia de *Terebripora,* enquanto a de *Spathipora* lembra, como disse FISCHER, uma *Sertularia.* E' preciso porém, não confundir o caracter colonial aludido nas diagnoses genericas, com estolões atravessadores, como se vêm no angulo superior direito da fig. 6 A, produzindo eles aí uma certa reticulação. Depois da eliminação da especie tratada no seguinte do genero *Terebripora,* no qual se achou colocada originalmente, este pode ser caracterisado pelas palavras «colonia reticulada».

Como se vê em uma figura da especie pleistocenica *Terebripora pacifica* (CANU & BASSLER 1923, t. 26 f. 13), além da especie assinalada, uma *Spathipora,* no lado esquerdo da microfotografia, tambem as conchas aqui em mão varias vezes acham-se perfuradas por mais que uma especie, quer cresçam *Terebripora ramosa* e *Spathipora ditrupae* em população mixta, quer *Spathipora sertum* e *T. ramosa* ou *T. orbignyana* (Fig. 3 B).

Baía de Santos, em varios lugares e em profundidades de 0-20 m. em varias conchas.

Distribuição geografica: Costas sudoeste e mediterranea da França, sem indicação batimetrica.

Spathipora ditrupae (NORM.) (Fig. 7A, B).

Terebripora ditrupae NORMAN, 1907, p. 208 t. 9 f. 4-7.

Nesta especie não é possivel distinguir o estolão primario dos restantes, nem indicar a direção do crescimento da colonia. O estolão acha-se situado mais profundamente que nas especies descritas de *Terebripora* e de *Spathipora* e por isso tem de formar canais mais compridos, para se comunicar com a superficie da concha. Importa o comprimento desses canaliculos em 40-50 μ; a largura do estolão, em 15 μ. A distancia entre os autozoécios é muito grande, a saber 1 mm., mais ou menos. Os cistidios têm posição perpendicular e são ligados ao estolão por curto canal. Atravessa a concha em posição quasi horizontal, e como se vê ao olhar de cima nos zoécios, deve inserir na parte superior do cistidio. O fundo proximal dos autozoécios fica escondido nas camadas mais profundas da concha. O contorno quasi orbicular da zona distal dos cistidios tubiformes e os orificios deles

são visiveis, sendo os ultimos, porém, assás irregulares. Nada se sabe quanto á configuração verdadeira do orificio; os dois seios, separados por pequena saliencia triangular, desenhados nos dois autozoécios da figura 7 B, verosimilmente efetuaram-se por corrosão ou quebradura secundarias na superficie da concha. Talvez correspondam á configuração da cuticula do zoécio quando evaginado. Acham-se então contraídos os musculos das 2 séries longitudinais (Fig. 2 D, *m*), os quais assim mantêm os tentaculos, bôca e anus evaginados. A contração aludida faz, além disso, salientarem-se para fóra duas faixas convexas formadas pelas rigidas faixas correspondentes da parede do cistidio, determinadas pelos pontos de inserção das fibras musculares. O meio da cuticula do cistidio entre as duas faixas achar-se-ia retraído na fase da evaginação, de maneira que se efetuaria a forma positiva refletida negativamente pelo orificio.

Segundo a posição perpendicular dos autozoécios e o crescimento geral, *S. ditrupae* será certamente colocada em genero separado. Difere quasi tanto de *Spathipora sertum* como das especies restantes de *Terebripora.* Enquanto, porém, não se conhecer o cistidio e a forma do orificio, parece conveniente adiar tal separação generica e colocar a especie no genero *Spathipora,* a cujos caracteres colonial e zoécial (v. p. 281) corresponde.

Foi por causa de uma ilusão ótica que Norman descreveu como lateralmente colocados os prolongamentos tubulares do estolão, os quais realmente se dirigem perpendicularmente para cima. E' mais provavel depender do modo de olhar na colonia, do que da direção do crescimento dela, a encurvação aparente dos tubulos de comunicação. Mas como faltaram no nosso material pontas livres de estolões, não chegámos a uma opinião definitiva a este respeito.

Baía de Santos, Sangava em ca. de 20 m. de profundidade, em conchas de *Lamellibranchiata (Cardiidae, Pectinidae).*

Distribuição geografica: Mar do Norte, perto das ilhas de Shetland, sem indicação batimetrica nos tubos calcareos de *Ditrupa (Polychaeta, Serpulidae).*

Spathipora-species incertae sedis.

Spathipora elegans Fisch.

Spathipora elegans Fischer, 1866, p. 309.

A colonia é ramosa e radiada, partindo tres estolões principais de um centro comum. As ramificações laterais são assás curtas. Os autozoécios côniformes alternam regularmente nos dois lados dos estolões e aproximam-se muito

um do outro. O pedunculo deles é curto, o orificio, arredondado, o seio, pouco prolongado.

Distribuição geografica: Costa chilena, no lado interno de conchas de *Calyptraea radians*, sem indicação batimetrica.

CHAVE PARA A CLASSIFICAÇÃO DAS RECENTES ESPECIES CERTAS DAS TEREBRIPORIDAE

Sendo contraditorias as diagnoses dos dois generos dadas no precedente (veja p. 281), precisa-se sómente diferenciação das especies. Os caracteres escolhidos para a chave seguinte são tais que poderão possibilitar determinação tambem de fragmentos pequenos.

A. TEREBRIPORA.

1 — Os estolões laterais sáem ao nivel dos autozoécios	2	
Os estolões laterais sáem distalmente dos autozoécios ou muito longe deles	*T. orbignyana*	(p. 284)
2 — A distancia entre os autozoécios sucessivos importa em ca. de 500-600 μ	*T. ramosa* . .	(p. 281)
A distancia entre os autozoécios sucessivos importa em ca. de 300 μ .	*T. fischeri* . .	(p. 286)

B. SPATHIPORA.

A distancia entre os autozoécios importa em ca. de 200 μ	*S. sertum* . .	(p. 288)
A distancia entre os autozoécios importa em ca. de 1 mm.	*S. ditrupae* .	(p. 291)

SHELL BURROWING POLYZOA

Abstract

A. General Part. The marine Polyzoa burrowing in calcareous shells and worm tubes constitute the family Terebriporidae, hitherto only known by the holes and furrows left by the living colonies. Since the discovery (d'Orbigny *1839) up to the last descriptions of recent* (Norman *1907) and fossil species* (Canu & Bassler *1923) the zooecia and stolons continued unknown, so that the position of the Terebriporidae within the Polyzoa and even their polyzoan nature remained doubtful. The finding of complete zooecia (Terebripora) and chitinous walls of zooecia and stolons (Spathipora) settles the family's place within the stoloniferous Ctenostomata. Although particular boring structures are wanting, the Polyzoon perfo-*

rates the shell actively and is not simply buried by the mollusc's continuous secretion of lime. The corrosions produced on calcareous substrates by incrusting Polyzoa (Hippothoidae and many others) are easily distinguished from cavities really mined within the lime by the Terebriporidae. Phagocytosis and respiratory processes must be made accountable for the dissolution of the lime; the numerous tubules connecting zooecia and stolons (fig. 6 D) with the shell's free surface seem to supply the living tissue of the Polyzoon with the necessary oxygen for the intense metabolism correlated with the boring activity. A short compilation of the various types of lime-mining organisms shows that chimical and mechanical methods are met with. As Ray Lankester *said, that animal tissues able to deposit lime in form of shells etc. also can resorb it, study of calcification in Polyzoa might enable further understanding of the lime-mining activities.*

B. Systematic Part. Descriptions of the 3 distinct recent species of Terebripora and the 2 valid ones of Spathipora, all found in the bay of Santos, mining superficially in living and dead shells of snails, bivalves and balanids, on the outer as well as on the inner side. Key to these species see p. 293.

BIBLIOGRAFIA

Ankel, W. E. — 1936 — Prosobranchia: Grimpe & Wagler, *Tierwelt Nord- & Ostsee,* pars IX. b 1, p. 1-240. Leipzig.

Arndt, W. — 1928 — Porifera: Dahl, *Tierwelt Deutschlands,* pars 4, p. 1-94. Jena.

Brehm, A. E. — 1918 — *Tierleben,* 4.ª ed. (O. zur Strassen), v. 1: Die niederen Tiere; Nick, L. & Grimpe, G., Stachelhäuter (Echinodermata), p. 333-387. Leipzig & Wien.

Brien, P. & Huysmans, G. — 1937 — La croissance et le bourgonnement du stolon chez les Stolonifera: *Annal. Soc. Royale Zoologique de Belgique,* Bruxelles **68,** 13-40.

Broch, H. — 1926-27 — Cirripedia: Kükenthal & Krumbach, *Handb. Zool.,* v. 3, pars 1, p. 503-552. Berlin & Leipzing.

Busk, G. — 1852 — *Catalogue of Marine Polyzoa* in the Collection of the British Museum pt. 1 Cheilostomata (part.) London.

Canu, F. & Bassler, R. S. — 1920 — North American Early Tertiary Bryozoa. *Smithson. Inst. U. S. Nat. Mus. Bull.,* Washington. **106,** p. 1-879 t. 1-162.

Canu, F. & Bassler, R. S. — 1923 — North American Later Tertiary and Quaternary Bryozoa. *Smithson. Inst. U. S. Nat. Mus. Bull.,* Washington. **125,** p. 1-302 t. 1-47.

Canu, F. & Bassler, R. S. — 1929 — Bryozoa of the Philippine Region. *Smithson. Inst. U. S. Nat. Mus. Bull.,* Washington. 100 v. **9,** p. 1-685 t. 1-94.

Cori, C. I. — 1928 — *Der Naturfreund am Meeresstrande,* 2.ª ed., 174 p. 22 tab. Wien & Leipzig.

Cori, C. I. — 1932 — Phoronidea: Grimpe & Wagler, *Tierwelt Nord- & Ostsee,* pars VII. c, p. 101-132. Leipzig.

Ehlers, E. — 1876 — Hypophorella expansa. *Abhandl. Königl. Gesellsch. Wissensch.*, Göttingen. (Physik. Klasse), **21**, p. 1-157 t. 1-5.

Fischer, P. — 1866 — Étude sur les Bryozoaires perforants de la famille des Térébriporides. *Nouvelles Archives du Mus. Hist. Nat.*, Paris. **2**, p. 293-313 t. 11.

Fischer, P. — 1870 — Bryozoaires marins du Départ. de la Gironde. *Actes Société Linnéenne de Bordeaux*, **27**, (ser. 3, v. 7, fasc. 4), p. 329-357.

Fredericq, L. — 1924 — Die Sekretion von Schutz-und Nutzstoffen: Winterstein, H., *Handbuch vergleich. Physiolog.*, **2**, fasc. 2, p. 1-256. Jena.

Geitler, L. — 1935 — Eine neue grüne Alge in den Schalen von Landschnecken etc., *Biol. gen.* Wien. **11**, p. 135-148, 2 tab.

Haas, F. — 1926 — Lamellibranchiata: Grimpe & Wagler, *Tierwelt Nord- & Ostsee*, pars IX d 1, p. 1-96. Leipzig.

Harmer, S. F. — 1915 — The Polyzoa of the Siboga Epedition, pt. 1, Entoprocta, Ctenostomata and Cyclostomata. *Siboga Exped.* **28**, *a*, p. 1-180 t. 1-12. Leiden.

Harmer, S. F. — 1926 — The Polyzoa of the Siboga Expedition, pt. 2, Cheilostomata Anasca: *Siboga Exped.* **28**, b. p. 181-501 t. 13-34. Leiden.

Harmer, S. F. — 1934 — The Polyzoa of the Siboga Expedition, pt. 3, Cheilostomata Ascophora I. Family Reteporidae. *Siboga Exped.* **28**, c, p. I-VII, 503-640 t. 35-41. Leiden.

Hastings, A. B. — 1930 — On the Association of a Gymnoblastic Hydroid (Zanclea protecta, sp. n.) with various Cheilostomatous Polyzoa from the Tropical E. Pacific. *Ann. Mag. Nat. Hist.*, London. ser. 10 v. **5**, p. 552-560.

Hentschel, E. — 1923-25 — Porifera: Kükenthal & Krumbach, *Handb. Zool.*, **1**, 307-418. Berlin & Leipzig.

Hincks, Th. — 1880 — *A history of the British Marine Polyzoa*, **1**, p. 1-601, **2**, t. 1-83. London.

Jelly, E. C. — 1889 — *A synonymic Catalogue of the recent marine Polyzoa.* London.

Jullien, J. — 1880 — Description d'une nouvelle espèce de Bryozoaire perforant etc., *Bull. Soc. zool. de France*, Paris **5**, p. 142-144, fig. 1-3.

Kühnelt, W. — 1930 — *Bohrmuschelstudien I.*: Palaeobiologica, **3**, p. 53-91, t. 4-11. Wien.

Kühnelt, W. — 1932 — Über Kalklösung durch Landschnecken: *Zool. Jahrb.*, Jena. (Abtlg. Syst. etc.) **63**, 131-144.

Lamy, E. & André, M. — 1936 — Annélides perforant les coquilles de Mollusques, *Comptes rend.*, XIIe Congrès internat. Zool., Lisboa. (sect. V), p. 946-968.

Levi, G. — 1935 — *Trattato di Istologia*, 2.ª ed. Torino.

MacGillivray, P. H. — 1868 — Descriptions of some new genera and species of Australian Polyzoa; etc., *Transact. Proceed. Royal Society Victoria*, Melbourne **9**, n.º 21, p. 126-148.

Marcus, E. — 1926 — Beobachtungen und Versuche an lebenden Meeresbryozoen. *Zoolog. Jahrb.* Jena. (Abtlg. Syst. etc.) **52**, p. 1-102 t. 1-2.

Marcus, E. — 1937 — Bryozoarios Marinhos Brasileiros I., *Bol. Fac. Phil. Sc. Letr. Univ. S. Paulo*, **1**, Zool. 1. p. 1-224 t. 1-29.

Marcus, E. — 1937 *a* — Bryozoen von St. Helena. *Vidensk. Meddel. Dansk Naturhist. Foren.*, Köbenhavn. **101**, 183-252.

MARCUS, E. — 1938 — Bryozoarios Marinhos Brasileiros II., *Bol. Fac. Phil. Sc. Letr. Univ. S. Paulo*, **4**, Zool. 2, p. 1-196, t. 1-29.

MORTENSEN, TH. — 1933 — The Echinoderms of St. Helena (other than Crinoids) *Vidensk. Medd. fra Dansk naturh. Foren.*, Köbenhavn, **93**, (1932-1933), p. 401-472 t. 20-22.

MORTENSEN, TH. & KOLDERUP ROSENVINGE, L. — 1910 — Sur quelques plantes parasites dans les Échinodermes, *Bull. Acad. Royale Scienc. Lettres de Danemark* (Overs. ov. det Kgl. Danske Vidensk. Selsk. Forhandl.) Köbenhavn, **4**, p. 339-354 t. 1.

MORTENSEN, TH. & KOLDERUP ROSENVINGE, L. — 1934 — Sur une algue Cyanophycée..., parasite dans un Oursin, *Det Kgl. Danske Videnskabernes Selskab. Biologiske Meddelelser*, Köbenhavn, **XI**, 7, p. 1-10.

NORMAN, A. M. — 1907 — On some British Polyzoa. *Ann. Magazine Natural History*, London, ser. 7, v. **20**, p. 207-212, t. 9.

ORBIGNY, A. D' — 1839; 1846 — *Zoophytes, Voyage Amérique Méridionale*, v. 5 pt. 4, Bryozoaires p. 7-23; t. 1-10. Paris, Strasbourg.

SCHMIDT, W. J. — 1928 — Perlmutter und Perlen: Pax & Arndt, *Rohstoffe des Tierreichs*, **2**, p. 122-160 t. 2. Berlin.

WATERS, A. W. — 1904 — *Bryozoa, Expéd. Antarct. Belge*, p. 1-114 t. 1-9. Anvers.

———o———

"EIMERIA MACIELI n. sp." PARASITO DO ANTILOPE AQUATICO (COBUS ELLIPSIPRYMNUS OGILBY)

POR

V. L. Yakimoff e S. N. Matchulski

Do Instituto de Veterinaria de Leningrado

Com estampa 25

Até agora, foram encontrados nos Antilopes e Cervos as seguintes eimerias: em *Capreolus capreolus* (L), *Eimeria capreoli* GALLI-VALERIO, 1927; em *Rupicapra rupicapra* (L.), *Eimeria rupicaprae* GALLI-VALERIO, 1927; em *Taurotragus oryx* PALL., *Eimeria canna* TRIFFIT, 1924 e *Eimeria triffiti* YAKIMOFF, 1933; em *Boselaphus tragocamelus* PALL, *Eimeria yakimovi* RASTEGAEV, 1930; em *Dama dama* L., *Eimeria gallivalerioi* RASTEGAEV, 1930.

Em Janeiro e Fevereiro de 1936 examinamos varias vezes as fezes de um antilope aquatico *(Cobus ellipsiprymnus* OGILBY) do Jardim Zoologico de Leningrado, tendo sempre encontrado neles eimerias. O exame era feito pelo metodo de DARLING.

Os oocistos eram ovais, amarelos, achatados num dos polos, com micropila. Tinham envoltorio de duplo contorno de côr amarela mais escura, com estrias radiadas. Envoltorio de 1,5 μ de espessura.

Tabela 1 — Dimensões dos oocistos

	24,0	26,0	28,0	30,0	32,0	34,0	Total
20,0	2 (0,83)	2 (0,77)	7 (0,71)	8 (0,67)	2 (0,63)		21
22,0		1 (0,85)	6 (0,79)	12 (0,73)	11 (0,69)	1 (0,65)	31
24,0					1 (0,75)		1
Total	2	3	13	20	14	1	53

Vemos nesta tabela que o tamanho dos oocistos é de 24,0 - 34,0 μ × 20,0 - 24,0 μ, média 29,7 μ × 21,2 μ; os maiores, 34,0 μ × 24,0 μ; os menores, 24,0 μ × 20,0 μ, os mais frequentes, 30,0 μ × 22,0 μ. Indice da forma: 1: 0,63 - 0,85; média 1: 0,72, os mais frequentes 1: 0,73.

Para o estudo da eimeria, as fezes foram diluidas, adicionadas de soluto de bicromato de potassio a 1 % e mantidas a 15° C.

A principio, o protoplasma granuloso que enche todo o espaço interno foi tomando a forma esferica, sempre rodeado do envoltorio que apresenta, ás vezes, pontos escuros.

Uma vez formado, o corpo esferico começa a dividir-se, daí resultando a formação de esporos. No meio com bicromato de potassio a 1 % dá-se a

esporulação dentro de 10 dias, ao passo que, na agua sómente, ao fim desse tempo apenas se forma o corpo esferico.

Os oocistos esporulados não apresentam corpo residual nem granulo polar. Os esporocistos, porém, apresentam corpos residuais.

Os esporos são ovais. Suas dimensões são de 10,2 - 14,0 μ × 4,0 - 6,0 μ. Cada esporocisto tem dois esporozoitos semilunares.

Vejamos a que especie pertence esta eimeria.

Pelas dimensões, presença de micropila e estriação radiada do envoltorio, aproxima-se da *E. canna* TRIFFIT, 1924.

Distinguem-se, porém pelo seguinte: 1) a *E. canna* é eliptica e a aqui descrita e ovalar; 2) o oocisto da *E. canna* contêm um pequeno corpo residual e o do presente coccidio não o possue. O coccidio ora descrito aproxima-se igualmente da *E. smithi* YAKIMOFF e GALOUZA, 1927, do gado bovino, tanto pela forma como pela existencia de micropila, ausencia de corpo residual e de granulo polar no oocisto assim como pelas dimensões dos oocistos.

Porem a *E. smithi* se diferencia da aqui descrita pela ausencia de estriação no envoltorio, o que nunca foi por nós observado em dezenas e, talvez, centenas de milhares de exemplares examinados.

Assim, a eimeria de *Cobus ellipsiprymnus* é uma especie nova que denominamos, em homenagem ao pesquisador brasileiro J. J. MACIEL, *Eimeria macieli* n. sp.

"EIMERIA MACIELI n. sp." A PARASITE OF THE WATER ANTILOPE (COBUS ELLIPSIPRYMNUS OGILBY).

Abstract

In this paper there is described a new species of Eimeria, parasitic in a specimen of the aquatic antilope, Cobus ellipsiprymnus Ogilby, in the Zoological Garden of Leningrado.

BIBLIOGRAFIA

GALLI-VALERIO, B. — 1927 — Notas de Parasitologia, *Zentralblatt f. Bakteriologie.*

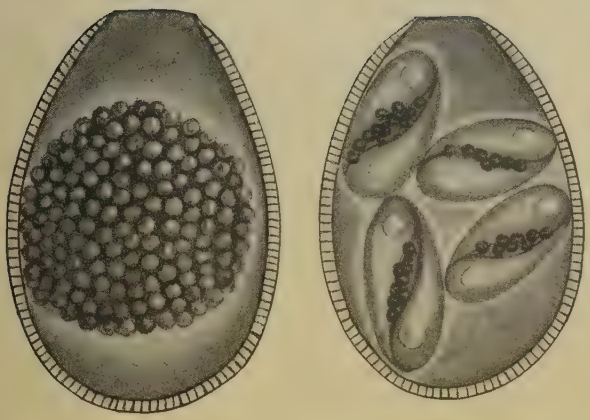
RASTEGAIEFF, E. F. — 1930 — Zur Frage über Coccidien wilder Tiere, *Archiv f. Protistenk.*, **71**, 377-494.

TRIFFIT, M. — 1924 — Note on a Eimeria n. sp. found in the faeces Eland. *Journ. trop. Med. a. Hyg.*, v. 27.

YAKIMOFF, V. L. — 1934 — Two species of Coccidia: Eimeria triffit n. sp. of the Eland (Orias canna) and Eimeria peruviana n. sp. of the Lama (Lama glama) *Parasitology*, **26**, N. 4.

YAKIMOFF, V. L. and GALOUZO, I. G. — 1927 — Zur Frage über Rinderkokzidiose. *Archiv f. Protistenk.*, Bd. 58.

YAKIMOFF, V. L. et MATIKASCHWILI — 1932 — La coccidiose du Daim, *Bullet. Soc. Pathol. Exot.*



A *B*

Figs. *A* e *B* — *Eimeria macieli* n. sp.

Vol. 9 — Art. 27 Dezembro de 1938

"PYRENOCHAETA SACCHARI n. sp." E UMA MANCHA DA FOLHA DA CANA DE AÇUCAR

POR

A. A. Bitancourt

Do Instituto Biologico de S. Paulo

Com as estampas 26-27

Num canteiro da Secção de Fitopatologia, na Cantareira, encontrei em Outubro de 1937, em touceiras de cana de açucar *(Saccharum officinarum* L.) da variedade EK 28, uma mancha de folha que, pelos caracteres, me pareceu não ter sido ainda descrita. Ao contrario da mancha geralmente atribuida a *Leptosphaeria sacchari* v. Br. de Haan, com a qual ela pode ser facilmente confundida no seu ultimo estagio, a nova mancha manifesta-se em folhas relativamente novas, onde tem o aspeto, na face inferior, de uma pequena área oval, regular e bem definida, quasi perfeitamente branca, e com as dimensões de 1,5 a 6 milimetros de comprimento por 1 a 3 de largura, orientada, na sua maior dimensão segundo o comprimento da folha. Na face superior da folha, a mancha é menor e muito menos visivel. Esta fase inicial, clorótica, da mancha, é perfeitamente caracteristica e permite distingui-la da de *Leptosphaeria* e das outras manchas causadas por diversos agentes. As manchas cloróticas iniciais são mais ou menos espalhadas, coalescentes quando muito numerosas, geralmente mais abundante na metade superior da folha e em regra muito mais numerosas num dos lados da nervura principal do que no outro.

Com o envelhecimento da folha, começam a aparecer na periferia das manchas pequenos pontos ou linhas avermelhados, que pouco a pouco se estendem, envolvendo a mancha até constituir uma estreita linha marginal côr de vinho tinto *(Corinthian purple)* (1), de 0,2 a 0,5 mm. de largura, frequentemente mais larga e de limites menos bem definidos nas duas extremidades da mancha do que nos lados, onde a linha é fina e bem definida. Nesta fase, a mancha não tem mais a parte central de côr quasi branca, como no inicio, tendo adquirido uma coloração parda muito clara *(vinaceous buff).* Ás vezes, a côr de vinho tinto da linha marginal parece estender-se ou desbotar para a parte interna e tambem para a parte externa da mancha, que fica dessa forma com uma côr mais uniforme nas beiras e no centro, mas com contornos menos bem delimitados.

(1) As cores são indicadas aproximadamente em portuguez. A indicação precisa em inglez é baseada em: Rigdway, R. - Color standards and color nomenclature. 43 pg. 1912.

Na fase final, a mancha tem, na face inferior, dimensões maiores do que no inicio: 3-8 × 1,5-3,5 milimetros, e perde o contorno nitidamente oval do inicio, pois a fina linha marginal côr de vinho, que a contorna, é mais irregular, sem, entretanto, perder a configuração alongada, com a dimensão maior no sentido do comprimento da folha. Quando as manchas são coalescentes, a fina linha marginal vermelha não separa, em regra, as diversas manchas em contáto umas com as outras, contornando, antes, o conjunto, em uma linha unica, que dessa forma parece envolver uma mancha unica, grande e muito irregular. Na face superior as manchas tornam-se mais aparentes do que na fase inicial e têm os mesmos caracteres que na face inferior, sendo porém a linha marginal mais desbotada e larga, com contorno menos bem definidos. Antes de todas as manchas de uma folha terem alcançado a fase final, nota-se que no lado da folha em que as manchas são menos abundantes, elas estão ainda na fase inicial, clorótica, ao passo que no lado oposto as manchas, muito numerosas e em grande parte coalescentes, estão já na fase final, com o centro pardo claro e a margem côr de vinho (Estampa 26, figs. *A* e *B*).

Nas duas faces das manchas, e geralmente na parte central, observam-se com uma lupa de bom aumento, desde a fase inicial, pequeninos pontos pretos que são constituidos por picnidios superficiais de um fungo imperfeito, encontrado constantemente associado ás manchas e que por esse motivo considero como o agente provavel da doença. (Estampa 26, figs. *C* e *D*) Com maiores aumentos, no exame da superficie da folha, a seco, nota-se que tais picnidios são superficiais e facilmente destacaveis, por inteiro, com a ponta de uma agulha. Muitos dos picnidios, porém não todos, apresentam na parte superior, em torno do estiolo, cerdas mais ou menos compridas. (Estampa 27, figs. *F* e *G*) Ao microscopio vê-se que os picnidios, que medem de 50 a 100 μ de diametro têm paredes pseudoparenquimatosas, feitas de elementos celulares isodiametricos, bem mais claras na região basal do que do lado do ostiolo, que tem paredes um tanto mais engrossadas, sem entretanto tomar nunca o aspeto de uma verdadeira papila. Nos picnidios munidos de cerdas, estas variam muito em numero, sendo ás vezes pouco numerosas, e em outros casos chegando a mais de 15. (Est. 27, fig. *I*)

Em secção transversal (Estampa 27, fig. *H*) verifica-se que os picnidios têm paredes de espessura de 3 a 10 μ, mais delgadas na base do picnidio e engrossando até a parte superior onde o ostiolo mede de 12 a 20 μ de diametro interno. Essas paredes são constituidas por 3 a 5 camadas de um pseudoparenquima escuro.

As cerdas são dirigidas irregularmente, porém de um modo geral no sentido radial, sendo algumas curtas e outras bem compridas, até

40 μ, mas todas de diametro mais ou menos uniforme, 2,5 a 5 μ, até a extremidade, que é arredondada, obtusa. As cerdas têm coloração identica á parte superior dos picnidios, isto é, fuliginea escura, quando vistas ao microscopio, e suas paredes são relativamente grossas: 0,6 a 1 μ.

O interior do picnidio é inteiramente hialino e quasi unicamente composto de esporos simples, hialinos, alongados e um tanto irregulares, com extremidades mais ou menos aguçadas, porém com a ponta arredondada e medindo 6-12 × 3 μ. O seu conteúdo é granuloso. (Estampa 27, fig. *J*).

Os esporos germinam facilmente dentro do prazo de 24 horas, sobre meio de batata-dextrose-agar, produzindo varios filamentos germinativos relativamente grossos e que muito cedo se incurvam, emitindo ramificações mais finas. (Estampa 27, fig. *K*).

Em meio de cultura de batata-dextrose-agar, (Estampa 27, fig. *L*) o fungo tem um crescimento relativamente lento, produzindo, no prazo de 20 dias á temperatura ambiente (entre 18 e 25° C.) um talo redondo, de contorno bem delimitado, compacto, saliente sobre a superficie do meio de cultura, com superficie convoluta, coberta de uma penugem branca, por baixo da qual se descobrem os picnidios, numerosos e dispostos irregularmente na parte central do talo, regularmente segundo duas a tres linhas concentricas na periferia, com dimensões maiores do que nas manchas das folhas, 140-300 μ e de coloração ferruginea *(ferruginous)* a principio, escurecendo mais tarde *(Hay's brown)*. Os picnidios deixam finalmente escapar o seu conteudo de esporos que apresentam-se como cirros de aspeto ceroso. Nesta fase os esporos são frequentemente munidos de um septo, sendo entretanto, por todos os outros caracteres, identicos aos esporos produzidos em condições naturais.

Muito embora as experiencias de inoculação que realisei dessem até a presente data resultados negativos, parece-me que a presença constante do fungo sobre as manchas, desde a primeira fase do aparecimento delas, indica que com toda a probabilidade é ele o causador de tais manchas.

A seguinte diagnose foi gentilmente traduzida para o latim por D. Bento Pickel.

Pyrenochaeta sacchari n. sp.

Maculis foliicolis, ovatis, primo albidis, inferne magis visibilibus, dein brunneolis circulo tenui coloris vinei marginatis, 3-8 × 1,5-3,5 mm., superne et prope nervum in altero latere abundantioribus, sparsis vel coalescentibus. Pycnidiis superficialibus, amphigenis, basi planis, leviter immersis, mammosis vel subglobosis, fuligineis, basi incoloribus, apicem versus nigrescentibus 50-100 μ diam. Ostiolo subpapillato, glabro vel 1-20 setis instructo, rectis vel tortuosis, radiatis, cylindricis, sed apice obtusis, 5-40 × 2,5-5 μ fuligineis. Conidiis hyalinis, con-

tinuis, oblongis, leviter irregularibus, apicibus subacutis, protoplasma granuloso 6-12 × 3 µ.

Habitat in foliis vivis Saccharí officinarum L. var. E. K. 28, in montibus Cantareira, São Paulo, Brasiliae.

A diagnose supra é baseada no especimen tipo colhido pelo autor na Cantareira, Estado de São Paulo a 11 e 13 de Outubro de 1937, depositado no herbario da Secção de Fitopatologia do Instituto Biologico de São Paulo sob o numero 2.769 e nas coleções micológicas do Bureau of Plant Industry, U. S. Department of Agriculture, Washington, D. C., Estados Unidos.

"PYRENOCHAETA SACCHARI n. sp." AND A NEW LEAF SPOT OF THE SUCAR CANE.

Abstract

Pyrenochaeta sacchari n. sp. has been found associated with a leaf spot of sugar cane (Saccharum officinarum L.) at Cantareira, São Paulo, Brazil.

The spots are oval and chlorotic in the first stage, later vinaceous buff, and bordered with a narrow, Corinthian purple, more or less irregular line, with the dimensions of 3-8 × 1,5-3,5 millimeters. The spots are more numerous in the upper half of the leaf, and often more numerous also on one side of the mid-rib than on the other one. In their inicial chlorotic stage the spots are easily distinguished from other leaf spots of the sugar cane, and especially from the common eye-spot with which is associated Leptosphaeria sacchari V. BR. DE HAAN, *but they are more easily confused with it in the latter stage. On the leaf spots, the pycnidia are amphigenous, superficial, and easily detached with a needle. They are lighter at the base which is flat and darker towards the slightly thickened ostiolum. The pycnidia are glabrous or covered with thick, straight or slightly irregular, roughly cylindrical, dark setae. The spores are simple, hyaline, subcylindrical or irregular, and measure 6-12 × 3 µ.*

EXPLICAÇÃO DAS FIGURAS

Estampa 26

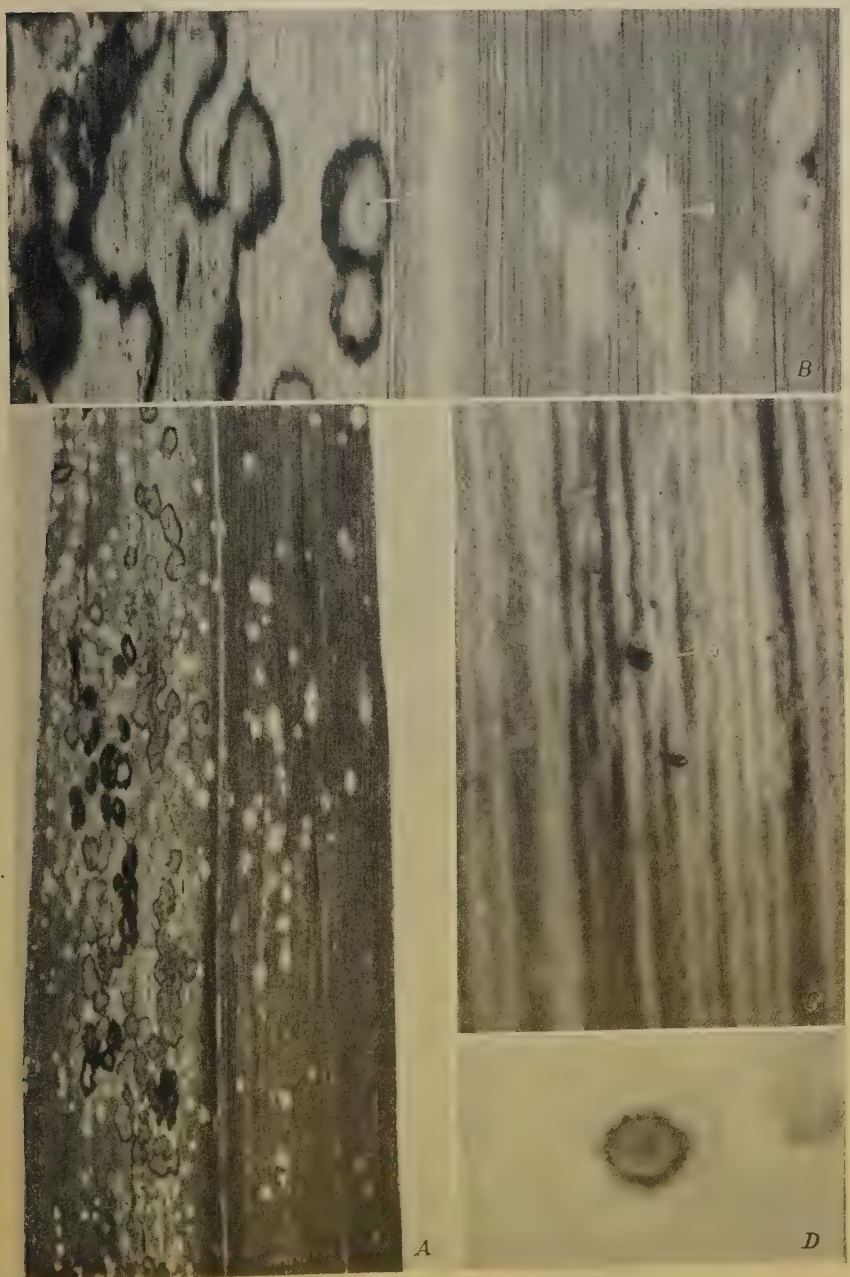
Fig. *A* — Folha de cana de açucar *(Saccharum officinarum* L.) da variedade EK 28, face inferior, com manchas atribuidas a *Pyrenochaeta sacchari* n. sp. × 1.
Fig. *B, C* e *D* — As mesmas manchas, mais aumentadas mostrando os picnidios superficiais, a. *B* × 5 ; *C* × 32 ; *D*, × 144.
Bitancourt e Rodrigues fot.

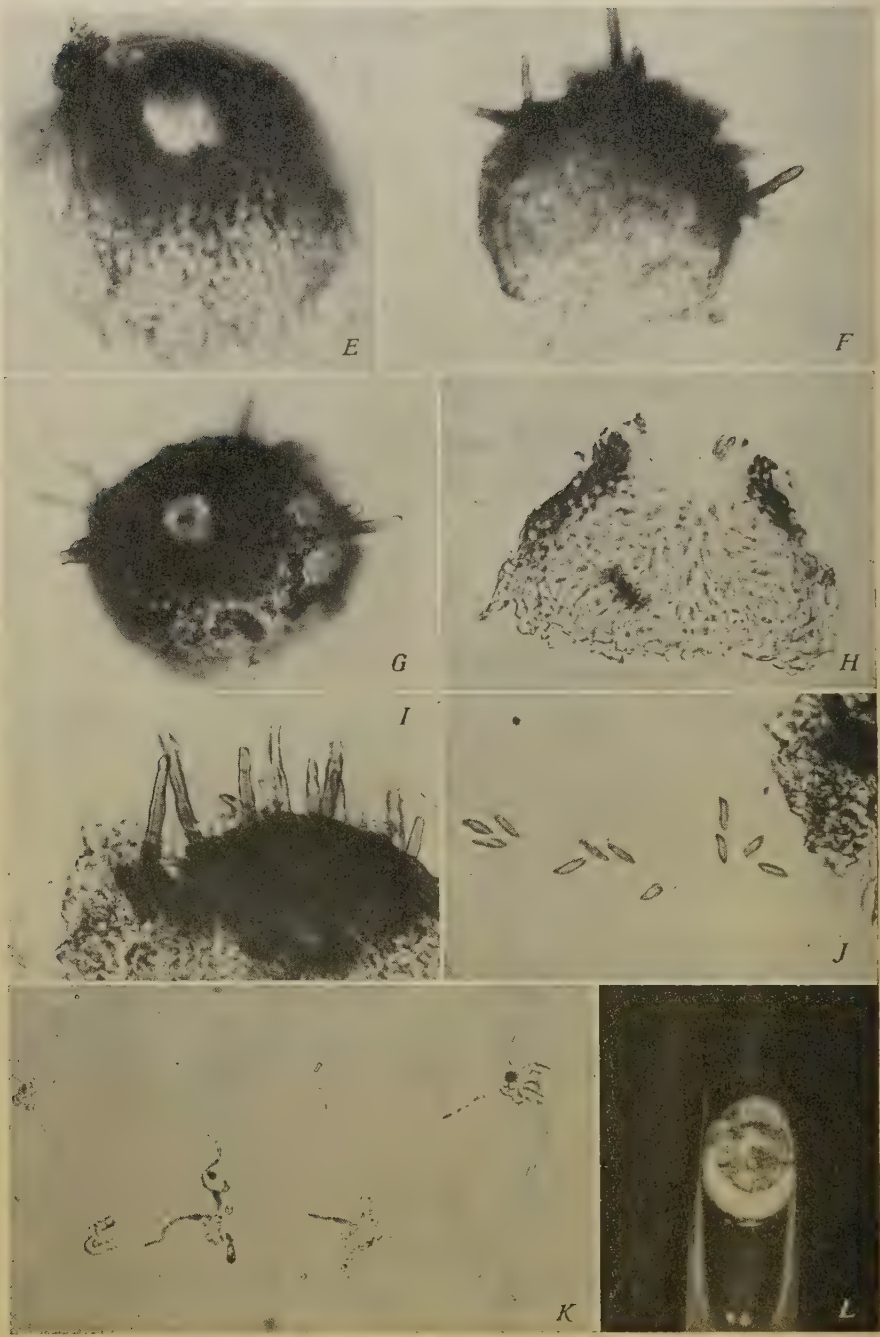
Estampa 27

Pyrenochaeta sacchari n. sp.

Fig. *E* — Picnidio glabro.
Figs. *F* e *G* — Picnidios com cerdas.
Fig. *H* — Secção transversal de um picnidio. O ostiolo dilatou-se na preparação pelo entumecimento dos esporos no lactofenol.
Fig. *I* — Parte superior de um picnidio, mostrando as cerdas.
Fig *J* — Esporos.
Fig. *K* — Esporos germinados, em meio de batata-dextrose-agar, no prazo de 24 horas.
Fig. *L* — Cultura com 20 dias, em batata-dextrose-agar.
E a *K*, × 500. *L*, × 1.
Bitancourt fot.

———o———


B
A
C
D


E
F
G
H
I
J
K
L

Vol. 9 — Art. 28 Dezembro de 1938

SOBRE A HISTOPATOLOGIA DA BRONCOPNEUMONIA CONTAGIOSA DOS SUINOS

POR

P. Bueno

Do Instituto Biologico de S. Paulo

Com as estampas 28-35

De ha muito é conhecida no Brasil a denominada broncopneumonia contagiosa dos suinos; entretanto ainda não foram feitos estudos detalhados da molestia, tanto com o fim de compara-la com as de denominações identicas descritas em outros paizes, como para estabelecer caractéres que por acaso lhe sejam proprios.

Em nossa literatura não se encontram trabalhos referentes á anatomia ou histopatologia da molestia.

Foi-nos dado observar que a doença evolue frequentemente isolada, mas algumas vezes aparece associada ao paratifo, apresentando, os animais, associação de lesões broncopneumonicas com processos necrotico-difteroides no intestino. A tal motivo se deve o haver-se generalizado a denominação de «pneumoenterite», chegando-se a designar como «formas pulmonares do paratifo», lesões tipicas da broncopneumonia contagiosa.

A confusão existente, aliás não só entre nós, talvez se tenha originado dos trabalhos de GLÄSSER (1922) que descreveu isoladamente as «alterações pulmonares do paratifo» e as da broncopneumonia enzootica.

Em nossas observações sobre casos com lesões broncopneumonicas isoladas ou associadas ás alterações intestinais, não nos foi possivel estabelecer uma diferenciação anatomica ou histologica entre os dois quadros. Acerca deste ponto, parece-nos interessante citar um trabalho recente de RADTKE (1937) que demonstrou a duplicidade de molestias nesses casos de existencia de lesões intestinais do paratifo juntamente com as alterações pulmonares, descritas sob a denominação de «pneumoparatifo»: trata-se de uma concomitancia do paratifo e da gripe dos leitões (descrita por KÖBE em 1933).

De acordo com as nossas observações feitas em São Paulo, a broncopneumonia ataca animais novos, e tem em geral uma evolução de carater crónico.

Os sintomas que se notam a principio são: conjuntivite catarral ou mesmo catarral-purulenta, anorexia e sonolencia. Posteriormente

esses sintomas se agravam. Sinais muito frequentes da doença são os espirros, tosse, perda de pelo, magreza e parada de crescimento.

São comumente observadas ocorrencias de um estado agudo em casos de decurso cronico, sempre em consequencia de resfriamentos. Nessa fase, a doença ainda mostra o seu carater de evolução relativamente lenta, podendo durar até um mez ou mais (ou passar de novo a um aparente restabelecimento).

Apezar de parecer mais comum uma evolução lenta, observamos dois casos hiperagudos, que levaram á morte em poucos dias.

No curso das necropsias feitas na Secção de Anatomia Patologica do Instituto tivemos oportunidade de estudar as alterações anatomo-patologicas e histologicas da doença em 12 casos espontaneos e 6 de infecção experimental.

Praticamente, em todo os seus principais caracteres, as lesões correspondem, como veremos adiante, ás descritas na gripe dos porcos por KÖBE e SCHMIDT (1934) e KREMBS (1938). Aproximam-se tambem das alterações referidas por SHOPE (1931) na influenza dos porcos, descritas por esse autor nos Estados Unidos.

ACHADOS DE NECROPSIA

As alterações anatomo-patologicas encontradas nem sempre foram as mesmas; correspondiam ás formas de evolução da doença.

Nos casos agudos as lesões reproduziam o quadro de uma broncopneumonia purulenta necrosante, chamando atenção o caráter humido das alterações (tipo gripal).

Segundo o modo de evolução, dividimos as alterações em agudas, cronicas e recidivantes (nestas, encontrámos uma concomitancia de lesões de caráter cronico com outras de caráter agudo).

Observamos mais raramente alterações isoladas do primeiro grupo e, com mais regularidade, as duas ultimas formas.

Nas formas agudas notámos que as porções anterior e média do pulmão são atingidas com grande intensidade; o lobo posterior é alterado principalmente nas partes perifericas, que ficam hepatizadas com consequente desenvolvimento de enfisema vicariante nas outras porções. As zonas lesadas tinham a consistencia aumentada e uma coloração variavel desde o amarelo acinzentado ao vermelho pardacento, tendo cada lobulo, ou grupo de lobulos, tonalidades diferentes em consequencia de estados de congestão, edema e hepatização cinzenta. A superficie do orgão é muito humida, principalmente nas regiões edemaciadas. Sob a pleura notam-se, nitidamente desenhados, os septos conjuntivos interlobulares, que ficam fortemente infiltrados por liquido seroso. Ocasionalmente aparecem entre lobulos hepatizados, outros sãos e proeminentes por terem sofrido um processo de enfisema de insuflação. Notámos sempre fócos de enfisema interstical no limite entre as porções lesadas e sãs. Zonas livres do processo inflamatorio mostravam-se de aspeto normal ou levemente hiperemiadas.

Em todos os casos examinados a superficie de córte era tambem muito humida e, em alguns pontos, assás hemorragica. Encontrámos áreas de edema

e de hepatização cinzenta alternadas com outras de enfisema. Os bronquios grandes, médios e pequenos tinham paredes espessadas e um conteúdo de aspéto purulento. O exame minucioso de um lobulo doente revelava, desenhadas em amarelo, as ramificações dos bronquiolos em suas porções terminais, que fundindo-se umas ás outras, constituiam fócos maiores, atingindo grandes áreas do lobulo, com formação final de abcessos contendo materia cremosa e esverdeada. A resolução purulenta e a necrose sempre nos parecem seguidas de uma rapida encapsulação. Os abcessos têm tamanhos variaveis, podendo medir 1 mm. de diametro, ou tomar grandes proporções do parenquima. Quando se assentam na superficie da pleura, podem formar um verdadeiro empiema, com aderencias na parte superficial. Vimos tres casos de eliminação espontanea do conteúdo purulento com formações de cavernas.

Os ganglios linfaticos regionais estavam fortemente tumefeitos e ás vezes chegavam á abcedação.

Nos casos de evolução muito rapida, anteriormente descritos, a infiltração inflamatoria atingiu todo o pulmão sob a forma de uma broncopneumonia catarral com fenomenos congestivos e descamativos intensos.

Nos casos cronicos, concluimos que a lesão quasi sempre se limita aos apices, aparecendo sob a forma de pequenos abcessos encapsulados ou já totalmente organizados, medindo alguns milimetros de diametro. A seu redor desenvolve-se esclerose do parenquima circundante, ao passo que as outras porções do pulmão não mostram, nesses casos, alterações.

As formas recidivantes (que observámos mais frequentemente) são, ao que parece, consequentes de uma reinfecção endogena, partindo dos fócos cronicos. Em tais casos, além dos fócos inflamatorios cronicos do apice, encontram-se todas as variantes das alterações do primeiro grupo.

As alterações anatomo-patologicas descritas por Krembs, na gripe dos porcos, são de uma broncopneumonia catarral nas porções anteriores do pulmão, associada, nos casos mais evoluidos, a abcessos e áreas de necrose. Refere tambem a avançada tumefação dos ganglios linfaticos bronquiais.

Shope descreve todas as alterações de uma broncopneumonia catarral atingindo as zonas anteriores do pulmão, mas não cita o encontro de abcessos ou necrose, talvez por se tratar sempre de casos agudos.

A tumefação dos ganglios linfaticos regionais tambem é importante.

HISTOLOGIA

As alterações histologicas, correspondendo naturalmente ás descritas macroscopicamente, apresentaram-se em fazes as mais diversas, desde os periodos iniciais de congestão e exudação, até o estadio final, caráterizado pela carneificação ou sequestro.

Em um mesmo preparado encontrámos frequentemente lesões inflamatorias recentes, como descamação do epitelio alveolar, edema, infiltração leucocitaria, etc., ao lado de um abcesso totalmente encapsulado.

Entretanto, para facilidade da exposição, e ainda para que se possa acompanhar mais fielmente a evolução das alterações, faremos aqui a descrição das nossas observações histologicas separadamente, agrupando-as em tres fases:

O periodo inicial
O periodo de estado e
O periodo final ou de cura.

a) No *periodo inicial* chamam a atenção as importantes alterações dos pequenos bronquios intralobulares, principalmente em suas porções terminais. Os bronquiolos são atingidos mais rapidamente e com maior intensidade. As celulas do epitelio da mucosa descamam para dentro da luz dos bronquios, formando frequentemente pequenas ulcerações (Estampa 31, fig. F). Em alguns bronquios, onde o processo inflamatorio era mais intenso, vimos destruição de grande parte ou de todo o epitelio. Os processos destrutivos não ficavam localizados só na mucosa, mas atingiam até a camada muscular, com desaparecimento total da parede. A sub-mucosa era frequentemente séde de pequena infiltração leucocitaria e de edema. A irritação inflamatoria do epitelio estava em alguns pontos representada por fócos de proliferação, tomando as celulas proliferadas um aspéto mais cubiforme, dispondo-se em muitas camadas (Estampa 31, fig. G).

Na luz bronquial encontrámos um exudato sero-celular, constituido por substancia homogenea coagulada, grande quantidade de leucocitos polimorfonucleares e celulas descamadas do revestimento epitelial. Esses elementos, a principio bem conservados, apareceram posteriormente com picnose nuclear e degeneração gordurosa do citoplasma.

Em torno de alguns bronquios deparámos frequentemente fócos inflamatorios constituidos por linfocitos e celulas histiocitarias proliferadas (Estampa 32, fig. H).

O parenquima pulmonar circundante, ao lado dos processos exudativos, mostrava fenomenos de intensa congestão capilar; em porções ainda não alteradas, já intensa hiperemia.

Em geral, os alveolos perdem totalmente a estrutura normal; os tabiques rompem-se, formando pequenas cavidades, ou aderem, constituindo áreas de atelectasia. No interior dos alveolos ou das pequenas cavidades, encontrámos um conteúdo celular representado por numerosos leucocitos polimorfonucleares, e celulas descamadas do epitelio alveolar. Em algumas áreas predomina a infiltração leucocitaria; em outras o exudato celular é formado quasi sómente pelos elementos epiteliais. Estes logo incham, têm picnose nuclear, degeneração gordurosa do citoplásma, e por fim cariolise. Interessante é o fato de termos visto ocasionalmente gigantocitos com grande numero de nucleos pequenos, dispostos na periferia ou agrupados em toda a extensão do citoplasma. Essas celulas apareciam nas cavidades alveolares, juntamente com outros elementos inflamatorios; são possivelmente originadas da proliferação do epitelio (Estampa 32, fig. I).

Nesta fase ainda não notámos deposição de fibrina. Um pequeno edema dos espaços conjuntivos parece ser constante.

b) Designamos como *periodo de estado,* a fase em que os processos exudativos se tornam fortemente pronunciados.

Em todos os casos o parenquima e o tecido conjuntivo intersticial mostravam-se muito alterados. Era intensa a infiltração edematosa dos septos, ficando as respectivas celulas e fibras, dissociadas pela interposição de liquido seroso, e pela infiltração de celulas mononucleares (edema inflamatorio) (Estampa 33, fig. J). Este edema estava associado a uma avançada dilatação dos vasos linfaticos, que chegavam a tomar totalmente os espaços conjuntivos. Em seu interior deparámos grande quantidade de monocitos e de polinucreares. Nesta fase a coloração de Weigert já revelou, em numerosos pontos, nitida quantidade de fibrina, que se acumulava em grandes massas. Nos canais linfaticos viam-se verdadeiros trombos fibrinosos.

Em casos mais evoluidos, vimos que as alterações bronquiolares progridem e tornam-se muito mais severas. Os bronquiolos ficam completamente cheios de um exudato muito rico em leucocitos e em fibrina. Observamos sempre ruptura ou mesmo destruição das suas paredes, com eliminação do conteúdo intrabronquiolar para o tecido peribronquial visinho e formação de microabcessos (Estampa 33, fig. K). Em torno de alguns bronquios a infiltração linfocitaria é assás densa.

O parenquima toma os caracteres da hepatização cinzenta: alveolos muito dilatados ou com os tabiques rompidos, aparecem ora cheios de uma substancia edematosa homogena, ora de grandes blócos de fibrina, tendo entre as malhas numerosos leucocitos, restos de celulas do epitelio e hemacias. Percebe-se que em certos pontos a infiltração leucocitaria predomina grandemente, enquanto em outros o edema se sobrepõe. Nos microabcessos formados pelo rompimento dos bronquiolos vimos colonias de bacterias, proliferadas com grande intensidade. Eram frequentes, no interior desses microabcessos, hemorragias consequentes á destruição dos capilares, com formação de fócos de necrose que progrediam ou se associavam a outros, tomando grandes porções de um lobulo (Estampa 34, fig. L). Em torno deles encontrámos algumas vezes grandes barreiras linfocitarias; em outras, antes do estabelecimento da necrose ou imediatamente após, apareceram sinais de uma reação proliferativa por parte dos elementos conjuntivos dos septos ou do tecido peribronquial. Na periferia das áreas destruidas, notavam-se então acumulos de celulas com nucleos grandes e claros (fibroblastos), elementos de caráter histiocitario, linfocitos e leucocitos eosinofilos.

Por fim, nas formas mais antigas, os processos exudativos do resto do parenquima persistiam, mas já em inicio de transição para a cronicidade.

Os capilares sanguineos, muito dilatados só em algumas áreas, se rompiam, enchendo de sangue alguns alveolos, que eram destruidos.

Os sinais de inflamação aguda desaparecem lentamente. O exudato dos bronquiolos torna-se aos poucos linfocitario e os fócos de necrose, quando pequenos, tembem são invadidos por linfocitos e celulas histiocitarias.

Nas porções restantes do parenquima os fenomenos reparativos eram traduzidos pela formação de um tecido de granulação, muito rico em fibroblastos, contendo ainda linfocitos, plasmacelulas, leucocitos polimorfonucleares e vasos néoformados em grande numero.

A congestão vascular é sempre um dos fenomenos que chamam a atenção pela intensidade.

Ao lado dessas porções descritas encontrámos outras ainda conservadas e envolvidas por densos valos linfocitarios com formação de foliculos linfoides (sequestro em inicio) (Estampa 34, fig. M). Dentro das áreas conservadas as bacterias parecem proliferar livremente. Encontrámos tambem no parenquima normal e com relativa frequencia, extensas áreas de forte enfisema vicariante (Estampa 35, fig. N). Nos septos ha moderada produção de tecido conjuntivo.

c) Caráterizamos o *periodo final* pelos fenomenos de sequestro. As porções onde o desenvolvimento microbiano é intenso sofrem rapidamente necrose de coliquação. Notámos que o valo linfocitario é pouco a pouco substituido por elementos conjuntivos: forma-se uma capsula, a principio pouco densa e infiltrada por linfocitos e alguns leucocitos eosinofilos e, depois, rica em fibras colagenas (Estampa 35, fig. O). Nos casos antigos encontrámos frequentemente deposição de sáis calcareos, na massa necrosada, e em um deles, organisação total do fóco.

Nos estados cronicos observamos frequentemente, pequenos depositos calcareos sobre o epitelio dos bronquios conservados. Do mesmo modo, mostrou-se comum o desenvolvimento de uma peribronquite cronica nas regiões visinhas mais preservadas.

Pleura — No estado inicial observamos sempre na face externa da pleura, pequenos depositos de fibrina, que nos estados mais antigos eram substituidos por espessamentos e sinequias. Nos casos em que existiam abcessos sub-pleurais, as paredes aderiam fortemente á pleura costal, em grandes extensões, com fortes reações fibrosas.

Ganglios linfaticos — Os ganglios linfaticos regionais mostraram-se sempre infiltrados por grande quantidade de leucocitos polimorfonucleares com formação de microabcessos, que ás vezes se resolviam num grande fóco de supuração.

Na fase cronica era nitida a proliferação conjuntiva em substituição ás porções destruidas chegando algumas vezes á fibrose total do ganglio.

CONSIDERAÇÕES SOBRE A PATOGENIA

Dados os carácteres histologicos, pode-se admitir que o agente, penetrando por via aerogena, chega ao pulmão através dos canais bronquicos. A lesão inicial seria de uma pronunciada bronquite e bronquiolite, com consequente e rapida propagação do processo aos alveolos correspondentes, e destes a outros, por via endobronquial. Essa disseminação endobronquial teria como consequencia o desenvolvimento da inflamação, em lobulos ou grupos de lobulos isolados, em estadios diversos.

Do mesmo modo parece-nos importante a disseminação por *via linfatica.* Pela lesão do epitelio bronquial, o agente penetraria na tunica propria do bronquio, e cairia nos canais linfaticos ou nos espaços perivasculares, espalhando-se em seguida pelos intersticios. Provavelmente por tal motivo, aparecem os septos fortemente edemaciados, infiltrados por celulas inflamatorias e com grande linfangiectasia.

Como outra consequencia mostram-se as *tromboses septicas dos vasos pulmonares,* conduzindo sempre á formação de grandes áreas de necrose, com forte proliferação bacteriana, e por fim aparecimento de sequestro.

DISCUSSÃO

Do exposto conclue-se que a broncopneumonia contagiosa dos suinos, que observamos em São Paulo, muito se assemelha á gripe e á influenza dos porcos (descritas na Europa e America do Norte) não só em suas alterações macroscopicas como tambem nas histologicas.

Como se sabe pelos trabalhos de Shope e Köbe, os agentes causadores da influenza e da gripe são virus filtraveis que, agindo sobre o pulmão, sensibilizam-no para certas bacterias, dentre as quais o *Bact. influenzae suis* tem um papel preponderante. *Virus* mais *Bact.*

influenzae suis associados, produziriam um quadro invariavel, caracterizando a gripe (influenza) dos porcos (SHOPE, KÖBE). Entretanto MOMBERG-JÖRGENSEN (1938) demonstrou recentemente a não obrigatoriedade da presença do *Bact. influenzae suis*.

Lesões pulmonares puras, produzidas pelo virus isolado, até hoje só foram estudadas experimentalmente por SCHMIDT (1935).

O quadro histologico é de uma infiltração linfocitaria e histiocitaria peribronquial com ativação do reticulo-endotelio dos ganglios linfaticos bronquiais. Pela infecção mixta, desenvolvem-se peribronquite e bronco-pneumonia catarral e mesmo catarral-purulenta, com áreas de atelecatasia e enfisema. Por fim sobrevem a forma indurativa ou de cura, KÖBE e SCHMIDT (1934), KREMBS (1938).

Não é de desprezar a possibilidade de se tratar da gripe dos porcos, no a que denominamos broncopneumonia contagiosa. As alterações histologicas servem-nos, portanto, para indicar o primeiro dos caminhos para o estabelecimento de uma identidade possivel entre as duas molestias.

Julgamos ainda conveniente chamar a atenção, mais uma vez, apoiados no trabalho de RADTKE, para o fáto de que a broncopneumonia produzida pelo virus da gripe em nada difere do chamado pneumoparatifo. Tendo-se demonstrado que na maioria dos casos de infecção natural e experimental com o virus da gripe, é possivel o isolamento da salmonela, e que a inoculação deste germen sem o virus não provoca o mesmo quadro, fica estabelecida a inconveniencia de se atribuir influencia causal á salmonela, mesmo nos casos em que ha lesões pulmonares e intestinais acompanhadas pela sua presença nos exames bacteriologicos.

Em estudos experimentais, que serão oportunamente publicados, acerca do papel de um virus como agente preparador das lesões descritas, já nos foi possivel em parte confirmar este fáto.

RESUMO

No presente trabalho, são descritas as alterações anatomo-patologicas e histologicas da broncopneumonia dos porcos que observamos em S. Paulo.

1 — Macroscopicamente, o quadro encontrado foi o de uma broncopneumonia catarral ou catarral-purulenta, atingindo comumente os lobos apical, médio, e grande parte do posterior. Essas alterações estavam frequentemente associadas á formação de áreas de necrose e e abcessos, localizando-se de preferencia nas porções anteriores.

2 — Histologicamente caracterizam-se os nossos achados pelo aparecimento de processos inflamatorios agudos, e cronicos, ocorrendo

em geral, associados num mesmo quadro: o periodo de inicio, representado por lesões de broncopneumonia catarral e purulenta, que se acentúa no periodo de estado, chegando, em fase mais adiantada, á necrose ou carneificação. O estado cronico, ou periodo final, seria traduzido pela formação de sequestro e organisação.

3 — Do ponto de vista da patogenia, tudo faz crer que o agente, penetrando pelo caminho bronquiogenico, espalha-se por via endobronquial e peribronquial, caindo por fim nos vasos linfaticos e sanguineos.

4 — As alterações assemelham-se ás descritas na gripe dos porcos. E' muito provavel a existencia de uma identidade causal entre a broncopneumonia e a gripe, o que está sendo objéto de estudos.

5 — As lesões em nada diferem das encontradas no denominado «pneumoparatifo», que, ainda de acordo com observações recentes, não constitúe uma alteração dependente do quadro do paratifo.

ON THE HISTO-PATOLOGY OF CONTAGIOUS BRONCO-PNEUMONIA IN SWINE

Abstract

In this paper both, macroscopical and microscopical lesions of infectious bronco-pneumonia of swine are described.

The lesions are those of a catarrhal or purulent inflammation affecting principally the anterior and middle parts of the lung and acquiring a marked character when the disease is in its second or third week. These lesions are followed by hepatization of entire lobes or by focal necrosis, resulting in the formation of abscesses. Another rather frequent lesion is a marked swelling of the bronchial lymphnodes. Usually the disease passes to a chronic stage in which the necrotic foci undergo both sequestration or organization. In the first case a thick layer of fibrous tissue is developed at the periphery of the necrotic lesions. In cases of organization all stages of scar tissue formation are observed.

Concerning the spreading of the virus, evidences are show suggesting that the etiologic agent, after causing the bronchial lesions, attains other parts of the respiratory organs reaching the lungs through the small bronchial cavities and the lymphatic and blood vessels through the bronchial wall.

All lesions found are of the same character as those described in infectious broncho-pneumonia in swine, and experiments are being carried out in order to compare our virus with the one which causes swine influenza.

As in all cases of the disease considered in this paper the pulmonary lesions are equal to those of the so called «pneumo-paratyphus of swine» there are evidences that bronco-pneumonias found in paratyphus are not caused by bacteria of the Salmonella group, as is usually admitted. This fact suggests that the pulmonary lesions are manifest before the appearance the Salmonella, and that this bacteria occurs as a secondary infection following a disease of the respiratory organs produced by a filterable virus.

BIBLIOGRAFIA

1 — Glässer — 1922 — *Die Krankheiten der Schweine.* Ed. Schaper. Hannover. *cf.* pp. 118-136 e 222-247.

2 — Hutyra u. Marek — 1922 — *Spezielle Pathologie und Therapie der Haustiere.* Ed. G. Fischer. Jena. **2**, 186-197 e 649-659.

3 — Kitt — 1923 — *Pathologische Anatomie der Haustiere.* Ed. F. Enke, Stuttgart. **2**, 615-620.

4 — Köbe, K. — 1932 — Über Befunde von influenza-ähnlichen Bakterien beim Schwein. B. T. V., n.º 48, 209-210.

5 — Köbe, K. — 1933 — Die Aetiologie der Ferkelgrippe. *Zbl. f. Bakter.*, **129**, 161-176.

6 — Köbe, K. — 1934 — Die Ferkelgrippe. D. T. W., **42**, 603-606.

7 — Köbe, K. — 1936 — Vergleichende Untersuchungen über die pneumotropen Virusarten und die durch sie bedingten Krankheiten bei Mensch und Tier. *Archv. Tierheilk.*, **71**, 149-181.

8 — Köbe, K. u. Schmidt, W. — 1934 — Differential-Diagnose zwischen chronischer Schweinepest und Ferkelgrippe. *D. T. W.*, **42**, 145-148 e 163-168.

9 — Köbe, K. — 1936 — Ferkelgrippe. *in Tierheilkunde und Tierzucht.* Editores: V. Stang, Berlim e D. Wirth, Wien. (Ergänzungsband) pp. 211-219.

10 — Krembs, J. — 1938 — Histopathologie der Ferkelgrippe. *Arch. Tierheilk.* **73**, 387-398.

11 — Lewis, P. and Shope, R. — 1931 — Swine influenza. *J. of exper. Med.*, **54**, 361-371.

12 — Manninger, R. — 1932 — Untersuchungen über Schweinepest und Ferkelparatyphus. *D. T. W.*, 113-120.

13 — Manninger, R. und Bakos, N. — 1935 — Über die Aetiologie der katarrhalischeitrigen Pneumonie der Ferkel mit Berücksichtigung der neuen Feststellungen bei der Ferkelgrippe. *Allatorvosi Lapók*, 125. Ref. *D. T. W.*, pp. 536. (1935).

14 — Momberg-Jörgensen, H. C. — 1938 — Die Aetiologie der Ferkelgrippe. *B. M. T. W.*, n.º 38, 573-576.

15 — Nieberle, K. — 1924 — *in* Joest — *Spezielle pathologische Anatomie der Haustiere.* Ed. R. Schoetz. Berlim. **3**, 689-692, 708-715, 717-724.

16 — Radtke, G. — 1937 — Zur Diagnose der Ferkelgrippe und Paratyphus der Schweine. *B. T. W.*, n.º 8, 113-116.

17 — Schmidt, W, — 1935 — Vergleichende Untersuchungen zur Pathologie pneumotroper Virusarten. *Arch. Tierheilk.*, **70**, 1-22.

18 — Sedlmeier, H. — 1933 — Histologische Veränderungen des Zentralnervensystems bei Schweine-Influenza, *M. T. W.*, **84**, 508-510.

19 — Shope, R. — 1931 — Swine influenza *J. of exper. Med.*, **54**, 349-359.
20 — Shope, R. — 1931 — Swine influenza. *J. of exper. Med.*, **54**, 373-385.
21 — Wahl, F. — 1935 — Anämie und Ferkelgrippe. *B. T. W.*, **51**, 385-391.
22 — Waldmann, O. — 1933 — Die Aetiologie des Ferkelkümmerns. Die Ferkelgrippe. *B. T. W.*, **49**, 693-697.
23 — Waldmann, O. u. Köbe, K. — 1935 — Diagnose, Verbreitung und Verbreitungswege der Ferkelgrippe. *B. T. W.*, **51**, 481-485.

EXPLICAÇÃO DAS FIGURAS

Estampa 28

Fig. A — Broncopneumonia — Forma hiperaguda — Forte edema das porções anteriores (notar o aspéto humido das zonas alteradas).
Fig. B — Forma hiperaguda — Disseminação do processo inflamatorio por todo o orgão. Nitidos depositos de fibrina sobre a pleura.

Estampa 29

Fig. C — Forma recidivante — Muitos abcessos encapsulados no apice e no lobo médio, esquerdo. Disseminação recente do processo inflamatorio para as porções perifericas. Restos de aderencias sobre a superficie do pulmão direito.

Estampa 30

Fig. D — Forma recidivante — Abcessos encapsulados ao lado de processos inflamatorios agudos.
Fig. E — Forma cronica — Numerosos abcessos encapsulados e fibrosados no apice esquerdo.

Estampa 31

Fig. F — Descamação do epitelio com formação de ulceras. Em alguns pontos, destruição total da parede do bronquiolo.
Fig. G — Proliferação do epitelio bronquial.

Estampa 32

Fig. H — Peribronquite. Notar tambem a forte proliferação do epitelio em comparação com o epitelio de um bronquio normal ao lado.
Fig. I — Formação de gigantocitos.

Estampa 33

Fig. J — Avançada dilatação do septo tendo no centro um vaso linfatico fortemente dilatado e contendo numerosos polinucleares e linfocitos.
Fig. K — Microabcesso formado pela rutura de um bronquiolo. No centro. restos da parede bronquial.

Estampa 34

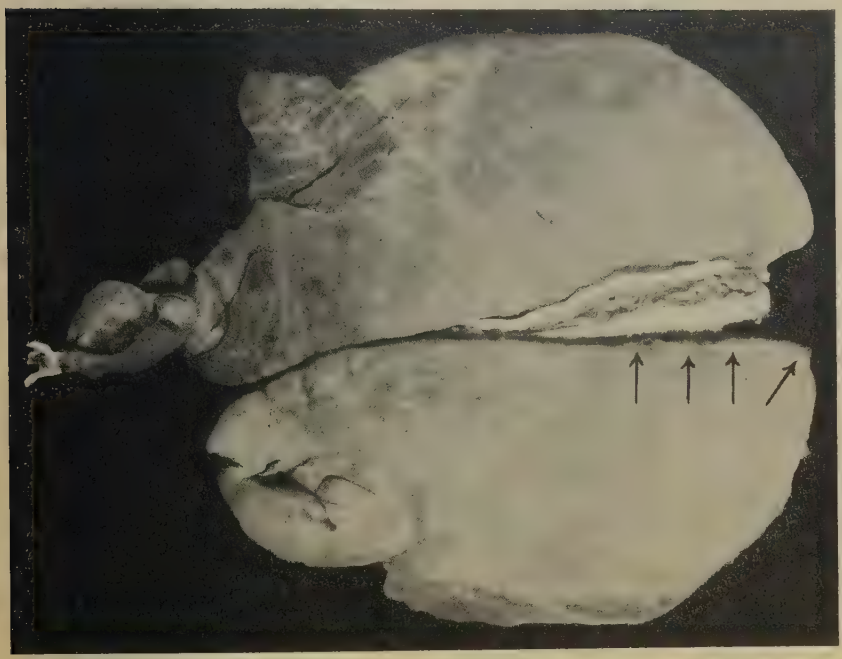
Fig. L — Grandes áreas de necrose ao lado de outras com processos exudativos agudos.
Fig. M — Valo linfocitario, envolvendo zonas onde a proliferação microbiana é intensa.

Estampa 35

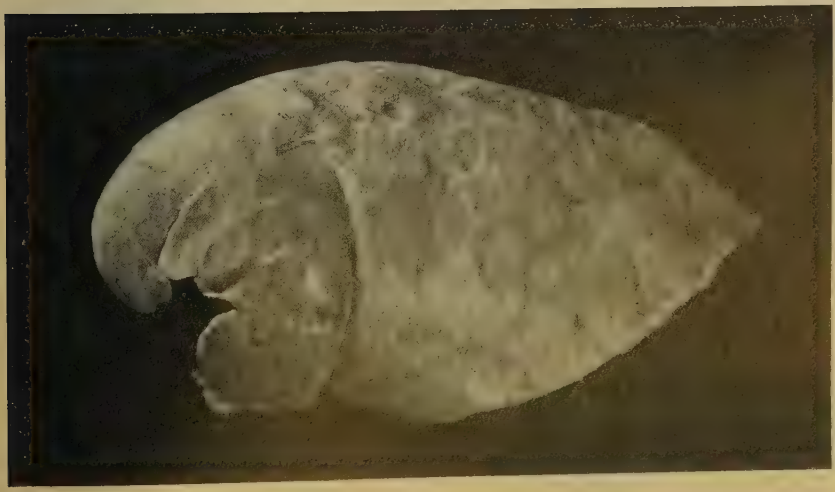
Fig. N — Enfisema vicariante.
Fig. O — Sequestro — Material necrosado envolvido por capsula conjuntiva densa.

———o———

B



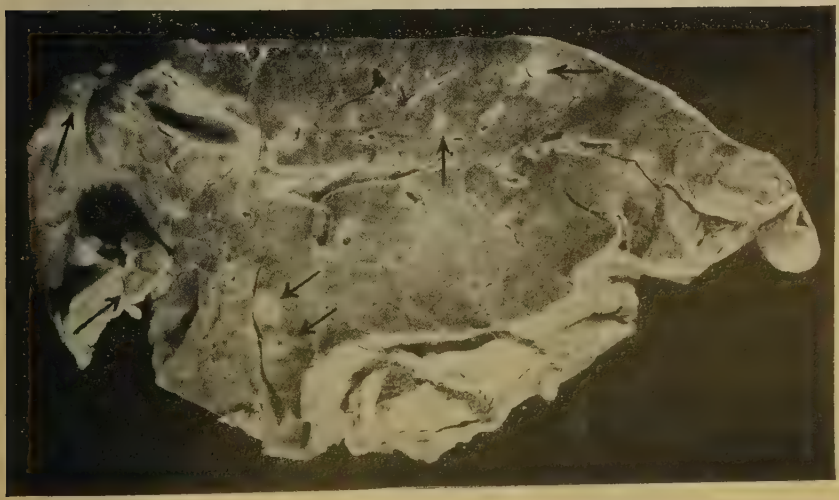
A

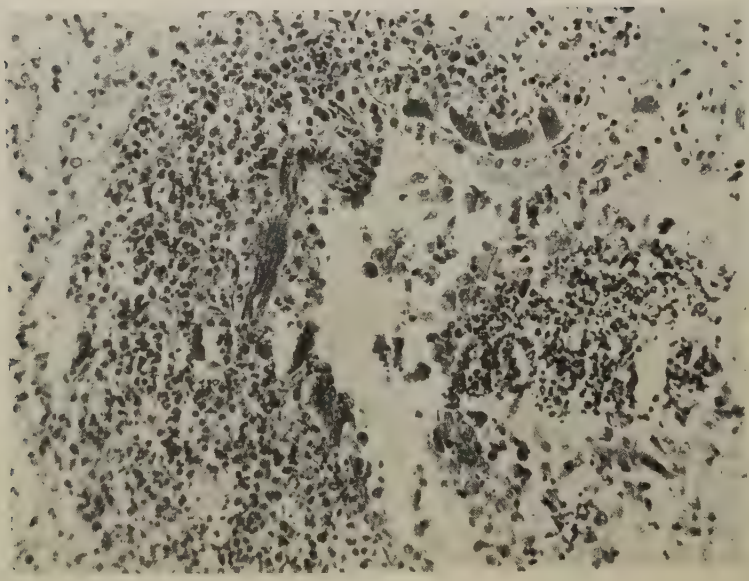


C

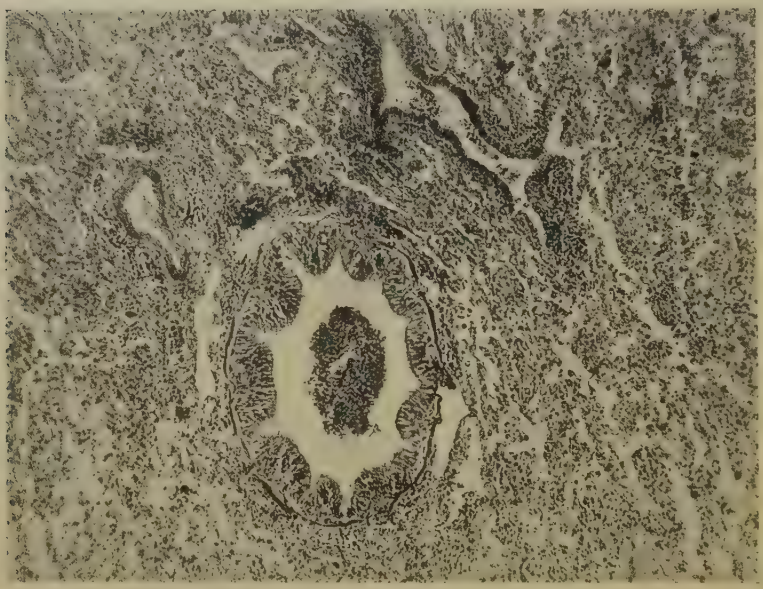
E

D

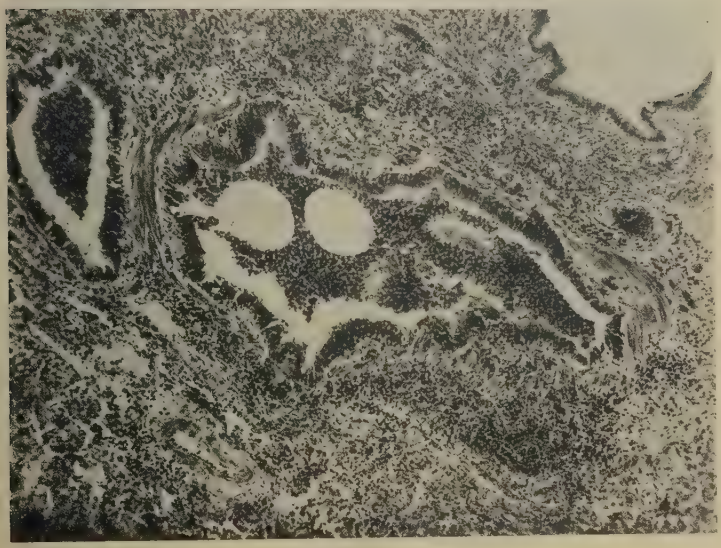




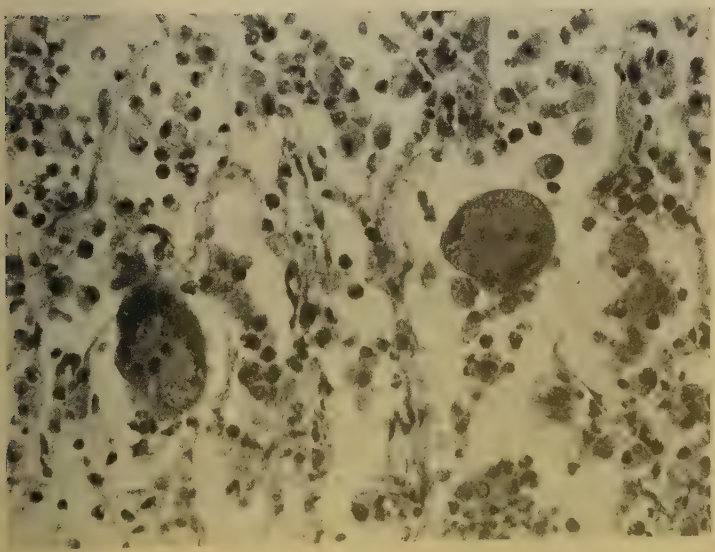
F



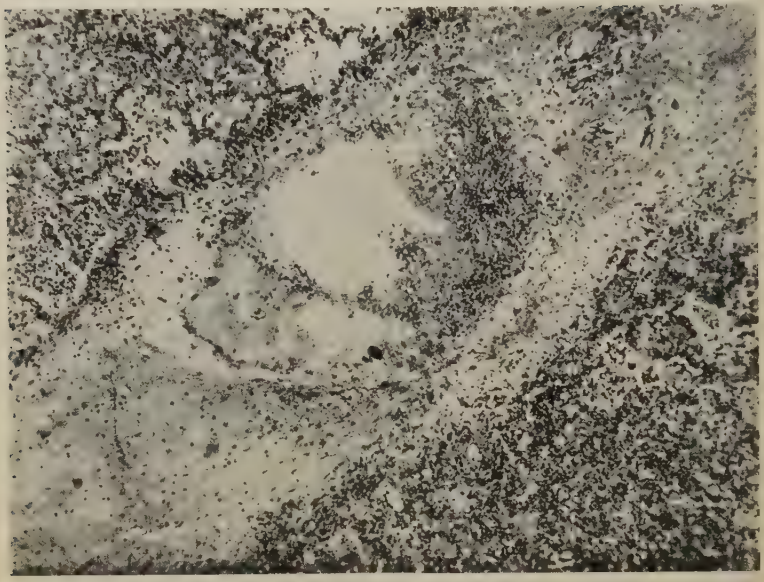
G



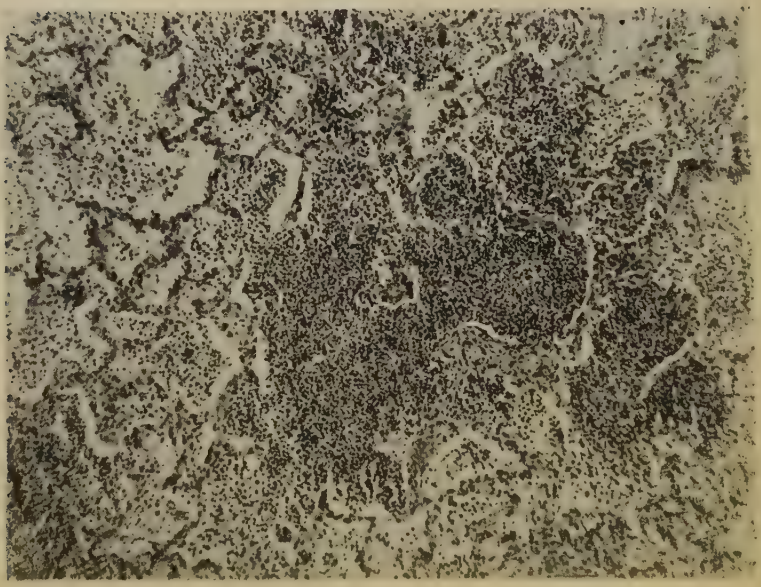
H



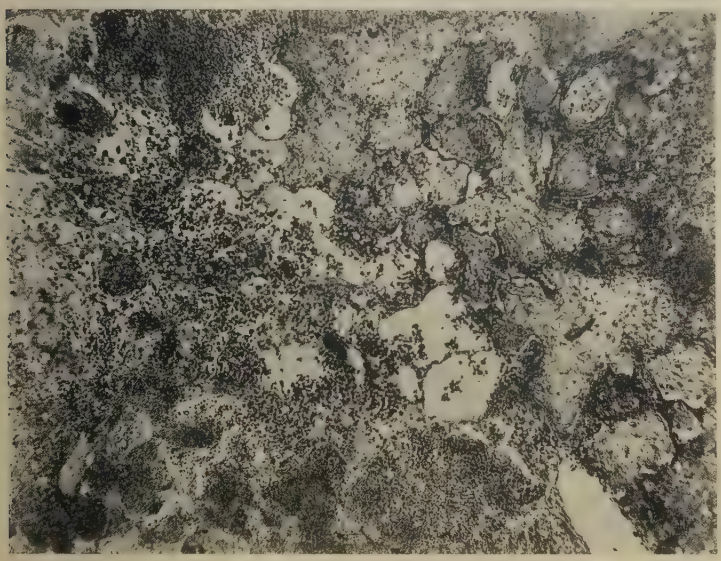
I



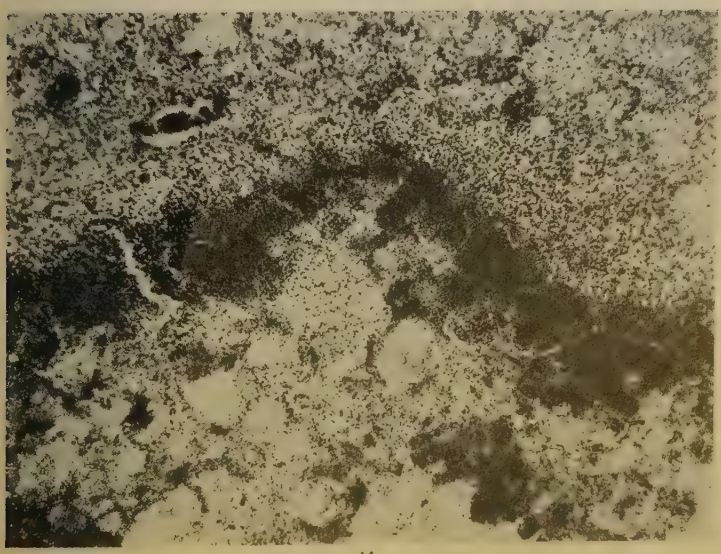
J



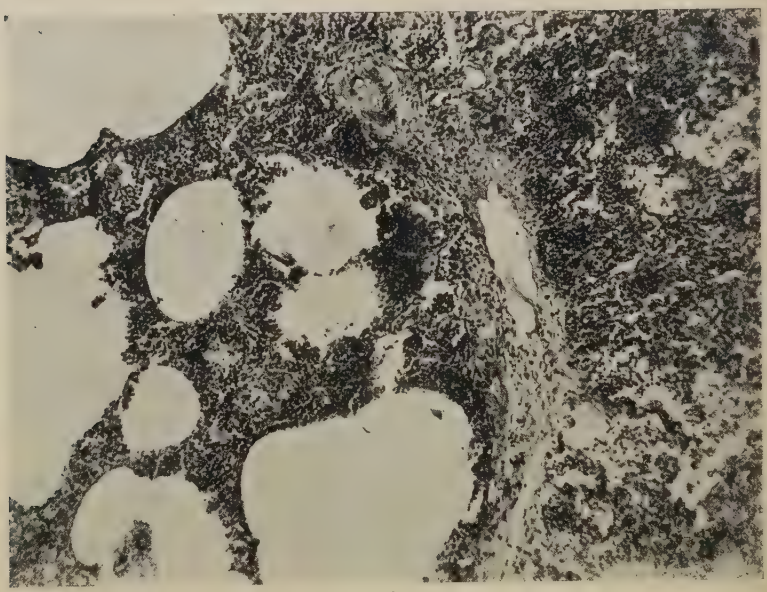
K



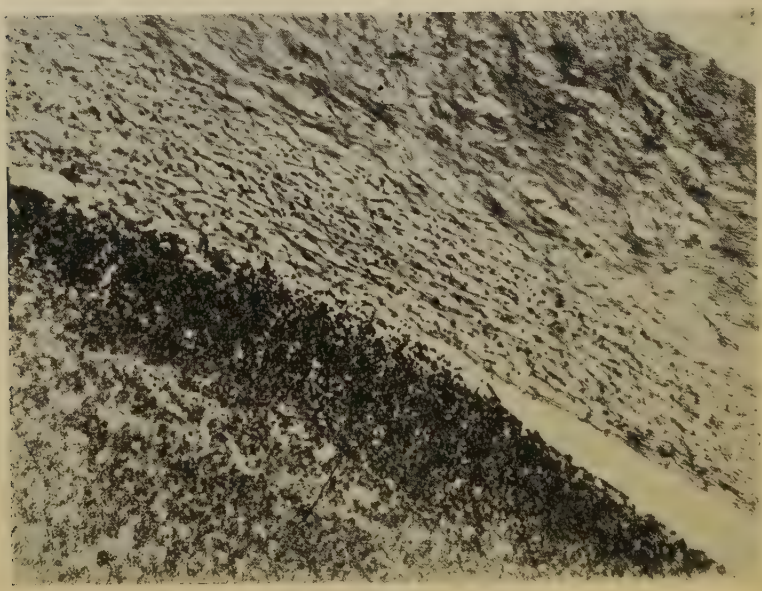
L



M



N



O

Vol. 9 — Art. 29 Dezembro de 1938

UMA NOVA ESPECIE DE "ALEYRODIDAE" (HOMOPTERA)

POR

Adolph Hempel

Do Instituto Biologico de S. Paulo

Com as estampas 36-38

O genero *Bakerius* foi criado por BONDAR em 1923, que o caracterizou em seu trabalho «Aleyrodideos do Brasil», pg. 35, da seguinte maneira:

«Asa dianteira arredondada com radius, setor radial, média e cubitus; geralmente maculada. Cabeça conica; antena de 7 segmentos dos quais o terceiro é o mais comprido. Pinça genital do macho, comprida e estreita. Ninfa com glandulas cerigenas compostas: um par cefalico e dois pares nos primeiros segmentos abdominais. Orificio vasiforme reticulado no fundo da segunda metade; lingula incluida. Margem com uma carreira de dentes submarginais. Tamanho grande.

Tipo *phrygilanthi* sp. n.

As maculas nas asas das duas especies deste genero o ligam intimamente aos generos *Leonardius, Dialeurodicus* e, menos, ao *Quaintancius*.»

Bakerius glandulosus HEMPEL, n. sp.

O estudo desta especie mostra que a margem possue duas carreiras de dentes submarginais e não apenas uma, como os demais membros deste genero.

Nympha — Foi encontrada sempre na pagina inferior da folha e, ás vezes, em grande abundancia. A fórma é oval, com a parte posterior do corpo um pouco mais larga do que a anterior. A côr é pardacenta ou amarelo-clara, com uma franja estreita de cêra branca ao redor da margem. Do dorso elevam-se seis tubos curvos de cêra branca; e quando ha muitos individuos na folha, esses tubos formam uma camada espessa por cima dos insétos. Tais tubos podem alcançar 14 mm. de comprimento, ou mais ainda.

A Casca Pupal — E' amarelada, chata, oval, com a extremidade posterior arredondada e, ás vezes, com a extremidade anterior um pouco acuminada; mede cêrca de 1,623 mm. de comprimento e cêrca de 1,177 mm. de largura. A franja de cêra branca ao redor da margem do corpo mede de 238 a 280 micra de comprimento. Ha, no dorso, tres pares de glandulas compostas, sendo um par localizado na região cefalica e os dois outros na região abdominal. Estas glandulas compõem-se de um copo com numerosas células ou estrias na parede interior e de um corno central acanalado. As duas glandulas cefalicas são um pouco menores do que as abdominais, medindo cêrca de 50 micra de diametro, ao passo que as abdominais medem cêrca de 58 micra. Os segmentos abdominais são nitidamente indicados no dorso. Ha ainda no dorso, dispostos em uma carreira submarginal, 28 pêlos grandes, e mais dois terminais, do mesmo tamanho, na margem posterior do abdomen.

O Orificio Vasiforme — é grande, cordiforme, com a margem anterior réta, e mede cêrca de 120 micra de comprimento e cêrca de 93 micra de largura, e tem um par de pêlos pequenos na base.

A lingula é grande e espatulada, e inteiramente incluida no orificio; tem a superficie inteiramente aspera e tem 4 pêlos perto da margem posterior. O operculo é transversal, um pouco mais largo do que comprido, com a margem anterior réta e a posterior bisinuada.

A margem do corpo é fina, com pequenas incisuras e mais duas carreiras submarginais de dentes grandes e arredondados, dois dos quais correspondem a cinco incisuras da margem, e 10 ocupam 152 micra da margem.

A Femea Adulta — E' de côr amarelada, com os olhos escuros; mede cêrca de 1,420 mm. de comprimento. A fronte é obtusamente conica, com os océlos cristalinos, e os olhos ovais. As antenas compõem-se de sete articulos com as seguintes dimensões: (1), 40 micra; (2), 122 micra; (3), 294 micra; (4), 142 micra; (5), 100 micra; (6), 50 micra; (7), 60 micra.

As asas anteriores são largas e arredondadas, hialinas, com cêrca de 15 pequenas manchas pardacentas, e forma oval ou arredondada. O radius, o setor radial e a nervura média são bem visiveis. A asa mede cêrca de 2,230 mm. de comprimento e 1,440 mm. de largura. As asas posteriores são mais estreitas, medindo cêrca de 2,028 mm. de comprimento e 1,014 mm. de largura. Estas são tambem hialinas, cada uma com cêrca de 7 pequenas manchas pardacentas.

O Macho Adulto — Aproxima-se da femea na côr e no tamanho. A pinça genital é robusta, réta, com a extremidade posterior um pouco curva, e mede cêrca de 0,406 mm. de comprimento.

Habitat. São Paulo, Capital. Coligido pelo autor sobre folhas de guaco, *Mikania amara,* em cuja pagina inferior as larvas são aglomeradas em grande numero. E' muito perseguida por uma pequena vespa, endoparasita, pois no material colhido, mais de 50 por cento dos exemplares estão parasitados.

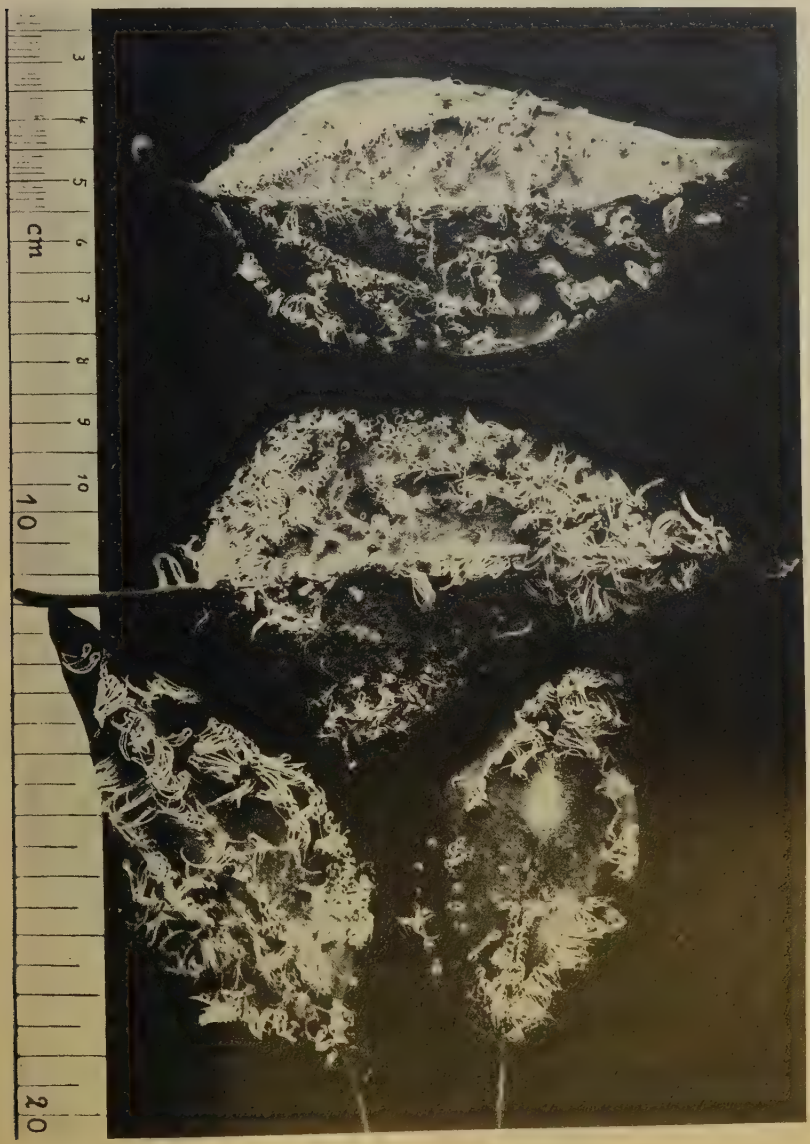
A presente especie é proxima a *Bakerius attenuatus* Bondar, porém distingue-se dela por ser maior, tanto no estado da ninfa como no de adulto; pela côr da ninfa; pelas incisões na margem da ninfa; pela carreira dupla de dentes submarginais; pela abundancia dos tubos cerosos dorsais e pela presença de 28 pêlos dorsais, dispostos em uma carreira simples, submarginal.

Esta especie foi encorporada ás coleções do Instituto Biologico de São Paulo sob o n.º 313.

A NEW SPECIES OF "ALEYRODIDAE" (HOMOPTERA).

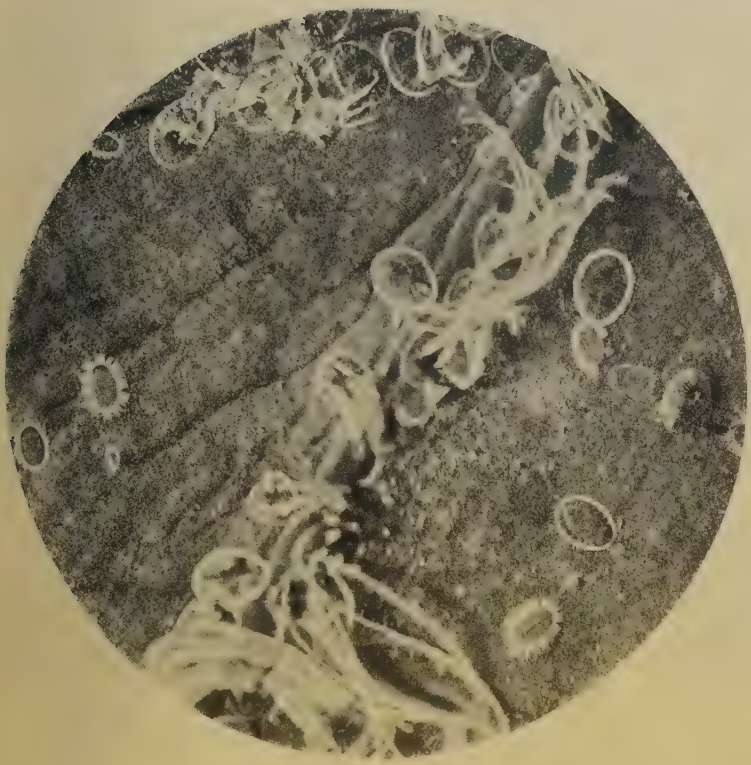
Abstract

The present paper deals with a new species of Aleyrodidae from S. Paulo, Brazil.



Bakerius glandulosus HEMPEL, n. sp.

Bakerius glandulosus HEMPEL, n. sp. Tamanho natural.



Bakerius glandulosus HEMPEL, n. sp. Muito aumentado.

Vol. 9 — Art. 30 Dezembro de 1938

SOBRE A NATUREZA DO NAMBIUVÚ DOS CÃES

POR

J. Moreira

Do Instituto Biologico de S. Paulo

Com estampa 39

Em Maio de 1938 recebemos um cão de Morro Agudo, Estado de S. Paulo, com uma molestia que os caçadores conhecem sob a denominação de Nambiuvú.

Partindo desse caso, iniciámos os nossos trabalhos, cujo objetivo era o seguinte: a) estudar convenientemente o parasita causador da molestia e a sua transmissão por meio de carrapatos; b) verificar a divisão esquizogonica do parasita e, finalmente, premunir cães contra essa hemoparasitose, que tão devastadora é para os nossos cães de caça.

No decorrer das nossas experiencias, recebemos mais cinco cães, sendo um de Orlandia, um de Cotia e mais tres de Morro Agudo, (S. Paulo), completando assim um total de seis cães com a molestia na sua forma natural e com os síntomas clinicos sempre constantes: forte hemorrágia pelas orelhas, magresa acentuada, anorexia, ictericia, halito fétido e grande prostração. Um desses animais apresentava diarréa sanguinolenta.

Até a presente data, inoculamos, com o material das diferentes proveniencias, um total de 91 cães. Destes, morreram em consequencia da molestia, 54. Um cão apenas foi sacrificado no dia do aparecimento abundante do parasita no sangue periférico. Neste animal, que foi sangrado a branco, inoculamos dois litros de liquido de Zencker, na jugular, para a obtenção de material bem fixado para histologia.

De todos esses animais foi colhido material em bôas condições para estudos de anatomia patologica.

Em todo o curso do nosso trabalho não nos foi possivel notar diferenças entre as infecções e parasitas que observamos e as descrições dos tratados sobre a infecção com a *Babesia canis* (Piana e Galli-Vallerio, 1895).

Transmissão — Nesta parte das nossas experiencias só nos foi possivel a transmissão artificial, o que foi feito sempre com inoculação de sangue por via subcutanea e, como dissemos, num total de 91 cães. Os estudos sobre a transmissão natural por meio de carrapatos acham-se ainda em andamento e serão relatados posteriormente.

O síntoma expresso pela denominação «Nambi-uvú», que em guaraní significa «orelha que sangra», parece-nos, ao contrario do que se supõe, nada ter de patognomonico para a molestia. Esse fáto, mais ou menos constante nas fórmas naturais, é verificado em consequencia das picadas de insétos nas orelhas dos cães doentes, que, em virtude da molestia, apresentam a cráse sanguinea muito modificada e tempo de coagulação muito dilatado. Os referidos cães doentes chegaram ao Instituto com hemorrágias pelas orelhas e todos os demais síntomas já citados, da molestia; interessante, porém, é que lógo cessaram essas hemorrágias, quando os doentes foram colocados em local que os garantia contra as picadas dos insétos hematófagos.

Os cães que recebemos com a fórma natural da molestia e que serviram de base ás nossas experiencias, apresentavam as fórmas clinicas conhecidas por Nambiuvú, menos hemoglobinuria. Em nenhum dos noventa e um cães, nos quais provocamos a molestia experimentalmente, nos foi dado observar as hemorrágias pelas orelhas. Apenas tres apresentaram hemoglobinuria.

Foi objéto de um interesse todo especial da nossa parte a procura das fórmas esquizogonicas na série de casos que examinámos. Assim é que, munidos de laminas de esfregaços e córtes de pulmão, figado, rim, baço e demais orgãos, de 53 casos da molestia, não nos foi possivel encontrar nenhuma fórma que sequer lembrasse a divisão esquizogonica dos parasitas.

Assim sendo, *Rangelia vitalii* (Pestana, 1910) Carini e Maciel, 1914, parece-nos indistinguivel de *Babesia canis* (Piana e Galli-Valerio, 1895).

O desenho e a fotografia têm por fim demonstrar a identidade das fórmas por nós encontradas com as da *Babesia canis*. (Estampa 39, figs. *A* e *B*).

Em um caso apenas, isto é, no cão n.º 51, encontramos, nos cortes e esfregaços do figado, formas semelhantes ás vistas por Carini e Maciel 1914, o que tivemos ocasião de comprovar quando o Prof. Carini teve a gentileza de nos mostrar suas bélas preparações, o que lhe agradecemos. Não conseguimos entretanto distinguir os parasitas que encontrámos, dos estádios esquizogonicos das especies do genero *Toxoplasma* (Nicolle e Manceaux, 1909).

Por isso, pode-se admitir de acordo com Wenyon em sua «Protozoology» como mais provavel, que as fórmas encontradas sejam de uma infecção intercurrente por *Toxoplasma sp.*

ON THE NATURE OF THE DISEASE "NAMBIUVÚ" OF DOGS.

Abstract

a) No difference was found between the symptoms of the disease known as «Nambiuvú», in dogs from different parts of the State S. Paulo, and the classical descriptions of canine Babesiosis.

b) The hemorrhages from the ears do not represent a pathognomical sign of that disease. Blood discharges do not occur in infected dogs that are protected from the bites of blood-sucking insects.

c) The exceptional discovery, in but a single case, of forms similar to those described by CARINI *and* MACIEL, *does not authorize us to consider them as schizogonic forms of Rangelia vitalii* (PESTANA, *1910)* CARINI *and* MACIEL, *1914, assumed to be the etiological agent of the «Nambiuvú» disease of the hunting dogs of Brazil; this being the case, it seems to us that Rangelia vitalii is indistinguishable from Babesia canis* (PIANA *and* GALLI-VALLERIO, 1895).

Therefore it may be admitted, in accordance with WENYON *in his «Protozoology», as more probable, that the discovered forms are those of an intercurrent infection by Toxoplasma sp.*

BIBLIOGRAFIA

BRUMPT, E. — 1938 — Identification des piroplasmes des chien du type Piroplasma canis. *Ann. Parasit. Huma. et Comp.*, **16**, 97-116.

CARINI & MACIEL — 1914 — Sobre a molestia dos cães, chamada Nambi-uvú e seu parasita Rangelia vitalii. *Ann. Paulist. Med. e Cir.*, **3**, 65.

FRÖHNER-ZWICK — 1926 — *Patol.* e *Terap. Vet.*, ed. Gustavo Gili - Barcelona, pp. 623-631.

HENNING, M. W. — 1932 — *Animal Diseases in South Africa,* ed. Central News Agency, Limited. South Africa. pp. 341-350.

NOCARD, E. et MOTAS, C. S. — 1902 — Contribution à l'étude de la piroplasmose canine. *Ann. Inst. Pasteur,* **16**, 257-590.

PESTANA, B. RANGEL — 1910 — O Nambiuvú. *In:* Col. de *Trab. do Instituto Butantan,* 1918. pp. 231-240.

WENYON, C. M. — 1926 — *Protozoology*, ed. Baillière, Tindal and Cox-London. pp. 1011-1022.

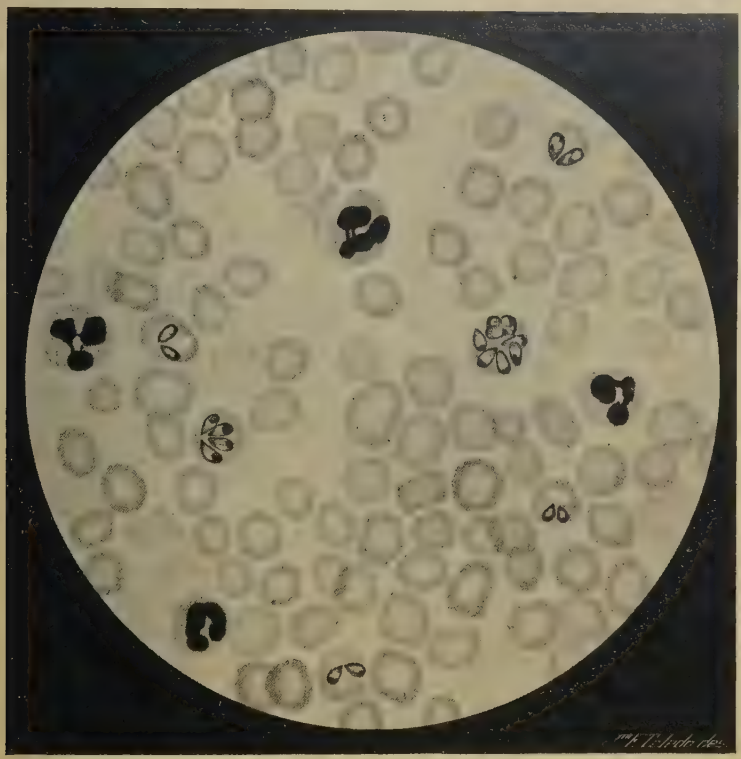
———o———

EXPLICAÇÃO DAS FIGURAS

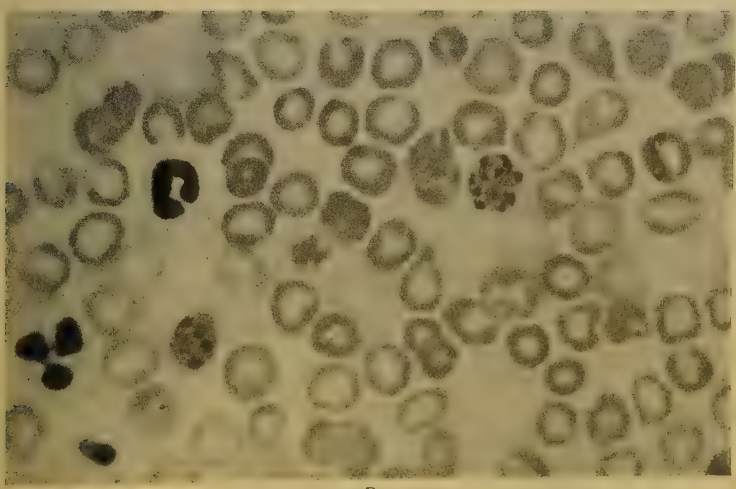
Estampa 39

Fig. *A* — *Babesia canis* (PIANA e GAL.-VAL.); formas desenhadas do cão n.º 69, inoculado com Nambiuvú.

Fig. *B* — *Idem*; fotografia de sangue do mesmo animal da fig. *A*.



A



B

Vol. 9 — Art. 31 Dezembro de 1938

OBSERVAÇÕES SOBRE AS PRÁGAS DA CULTURA ALGODOEIRA NO NORDESTE E NORTE DO BRASIL

POR

E. J. Hambleton e H. F. G. Sauer

Do Instituto Biologico de S. Paulo

Afim de obter melhores esclarecimentos sobre o comportamento das prágas prejudiciais á cultura algodoeira no Nordeste e Norte do Brasil, cujo confronto sería favoravel e util á realização dos trabalhos que vêm sendo executados nas condições do Estado de São Paulo, com o assentimento do Exmo. Secretario da Agricultura, Dr. Mariano Wendel, foi autorizada pelo Exmo. Snr. Diretor do Instituto Biologico de S. Paulo, Dr. H. da Rocha Lima, uma viagem áquela região do paiz, nos mezes de Setembro e Outubro do corrente ano.

Foram percorridos aproximadamente 4.200 kms. nas diferentes zonas do Nordeste e Norte, tendo-se tido a oportunidade de visitar a maioria das principais regiões onde o algodão é cultivado.

Tanto nas fazendas como nas Estações Experimentais ou Campos de Sementes, quer as variedades anuais, quer as perenes, foram observadas nas condições do campo.

Apesar de existirem diversas informações sobre as prágas dessas zonas, são ellas informações mais esparsas, e nem sempre facilmente acessiveis. Iglesias (1916) e Costa Lima (1918) foram possivelmente os unicos que incorporaram informações mais detalhadas sobre as principais prágas dos algodoais daquelas regiões. Recentemente, Pyenson (1938) publicou notas sobre os insétos de varias culturas no Estado de Pernambuco.

No presente trabalho mencionam-se breves notas sobre o clima e condições gerais das varias regiões, juntamente com as informações sobre as prágas mais importantes. Embora as condições da cultura algodoeira variem consideravelmente com as diferentes zonas, e não obstante o tempo não ter permitido um estudo mais detalhado, acreditamos que o seguinte relatorio apresenta uma ideia geral dos insétos, bem como das atividades das principais prágas que atacam os algodoeiros.

Os autores externam seus agradecimentos ás seguintes pessôas, cuja colaboração e interesse muita facilidade lhes proporcionaram no decurso da viagem: Dr. Margarinos Torres, Chefe do Serviço Federal de Defesa Sanitaria Vegetal; Drs. Oscar Guedes (Pernambuco), Clarindo Gouveia (Paraíba), Juvencio Lyra (Rio Grande do Norte), Esme-

rindo Parente (Ceará) e Amaro Silva (Pará), Inspetores Chefes do Serviço de Plantas Texteis do Ministerio da Agricultura; Dr. J. Augusto Trindade, Chefe dos Serviços Complementares das Obras Contra as Secas e Dr. Edgard Caldeira, Inspetor do Serviço de Defesa Sanitaria Vegetal (Pará).

ALGUMAS CARATERISTICAS DAS REGIÕES ALGODOEIRAS DO NORDESTE E NORTE DO BRASIL

A cultura algodoeira é uma das mais antigas e das mais importantes de todas as exploradas no Nordeste, constituindo a principal fonte de renda de uma área extensa e variada que compreende grandes zonas dos Estados de Pernambuco, Paraíba, Rio Grande do Norte e Ceará. Apesar da geral semelhança existente entre as condições desses quatro Estados, cada um deles apresenta regiões bem típicas, em que tais condições são diferentes, tornando muito complexos os problemas que se oferecem aos lavradores e especialistas.

Embora, encaradas nos seus detalhes, devam comportar outra divisão, as áreas algodoeiras desses Estados podem, para os fins deste trabalho, ser divididas, de uma maneira perfuntoria, em tres zonas distintas:

A zona litoral e da mata compreende uma área estreita que se extende ao longo das costas de Pernambuco, Paraíba, Ceará e parte do Rio Grande do Norte. Salvo a região imediatamente proxima da costa, que geralmente não é adequada á cultura do algodão, esta zona póde ser comparada de certo modo a determinadas regiões dos Estados de Minas Gerais e S. Paulo, no que concerne ás condições para a agricultura. Na verdadeira zona da mata ainda existem muitas florestas, e a cana de açucar, cultivada de preferencia nos terrenos mais baixos, é a principal lavoura. As condições existentes para a cultura das variedades de algodão erbaceo são muito satisfatorias. O solo é fertil e as chuvas são bastante uniformes, variando a média anual da quéda pluviometrica, de 800 a 900 mms.

Durante os ultimos anos a cotonicultura tem-se desenvolvido de um modo notavel, especialmente nas zonas visinhas de Gloria de Goitá e Correntes, em Pernambuco, e de Pilar, na Paraíba.

A zona agreste e da caatinga, que é uma verdadeira zona de transição entre as da mata e o sertão, compreende aproximadamente duas vezes a área ocupada pela zona litoral e da mata. Uma grande parte desta região, cuja topografia e flóra são muito variadas, está situada nas fraldas da serra da Borborema e seus contrafortes. Na zona agreste de Pernambuco existem vastas áreas de vegetação escassa,

nas quais predominam as especies de pequeno porte. Dentre estas, pódem ser citadas como as mais típicas as seguintes: as diferentes especies de cactos *(Cereus* e *Pilocereus* spp.) e coqueiros *(Cocos* spp.), baraúna *(Melanoxylon brauna* SCHOTT), anjíco *(Caesalpinia* sp.) jurema preta *(Mimosa hostilis* MART.), sendo tambem muito comuns plantas das familias Urticaceas e Solanaceas. Nesta zona o algodão é cultivado em escala consideravel. A variedade «mocó» é plantada em pequenos campos isolados e resiste bem ás condições climaticas muito adversas, improprias ás variedades erbaceas. Estas são cultivadas em muito menor extensão nas localidades mais favoraveis. O regimem de chuvas é muito escasso, não havendo época fixa para o plantío. Na Paraíba, a zona da caatinga póde subdividir-se em sêca e humida. Em vista disso ha maior plantio das variedades anuais, especialmente nas proximidades de Alagôa Grande, nos logares de topografia mais conveniente. As culturas do milho e mandióca são tambem de grande importancia nessa região. A zona denominada caatinga sêca é bem diversa das áreas similares que existem em Pernambuco. As especies vegetais mais carateristicas são, entre outras: a caatingueira, *(Caesalpinia* sp.), o marmeleiro *(Croton* sp.), o joazeiro *(Zizyphus joazeiro* MART.), a canafistula *(Cassia* sp.), a jurubeba *(Solanum* sp.), o mandacarú ou cardeiro *(Cereus jamacarú* DC.) e a barriguda *(Chorisea ventricola* MART.). A variedade «mocó» é a mais aconselhada para essa zona, porém as variedades erbaceas são comumente cultivadas em escala assás consideravel.

No Rio Grande do Norte existem condições semelhantes ás da Paraíba nas regiões limitrofes; e por não termos percorrido outras zonas que não as do Seridó e do litoral sêco, nenhuma informação podemos acrescentar ás demais. Esta tem, neste Estado, certa semelhança com a caatinga sêca da Paraíba; é porém uma região de vegetação mais densa. Ha certa abundancia de vegetais menos comuns na caatinga da Paraíba, tal como a umburana *(Torresea amburana* SCHW. et TAUB.), não existindo comumente as mesmas especies de cactos. Aconselham para essa zona a variedade «verdão», a qual não prospera facil e lucrativamente em outras regiões.

A zona do sertão ocupa a maior parte dos quatro Estados: começando a varios quilometros a oeste de Garanhuns, extende-se na direção norte até Pesqueira e Caruarú, em Pernambuco, e seguindo o rumo de Campina Grande até Araruna, na Paraíba, e daí até Lages, no Rio G. do Norte, excluida a região do Seridó, prolonga-se para os limites oeste dos Estados citados; não é porém, uniformemente distribuida e sofre certas variações em determinados trechos. Essa vasta

área tem geralmente as condições típicas de um deserto semi-arido durante a parte do ano em que os rios permanecem completamente sêcos. Excetuando-se os joazeiros *(Zizyphus joazeiro* MART.), as oiticicas *(Licania rigida* BENTH.), os faveleiros *(Cnidoscolus* sp.), a jurema preta *(Mimosa hostilis* MART.), as diversas Cactaceas e Bromeliaceas, a maioria dos outros vegetais tornam-se praticamente dormentes na estação sêca, permanecendo assim até que sobrevenham as breves mas intensas chuvas que cáem em ocasiões irregulares nos mêses de verão, ou «inverno» como é designada a época chuvosa naquelas regiões.

A região do Seridó, assemelhando-se á do sertão, manifesta caraterísticas especiais quer quanto á natureza do solo, quer com relação á vegetação. Aqui se notam comumente as especies de jurema preta *(Mimosa hostilis* MART.) e a graminea vulgarmente conhecida como «capim panasco».

Existem no sertão muitas serras em estado de desagregação, havendo igualmente inumeraveis vales e rios. Nestes grandes vales e ao longo dos leitos dos rios, o solo é fertil; e onde se conserva suficiente quantidade de humidade, são cultivadas, além de outras plantas, o algodão, a mandioca, a batata doce, a cana de açúcar, etc.

Uma grande parte do sertão consiste em vastas planicies, as quais são muito pedregosas e cobertas de uma vegetação rasteira. Geralmente a grande maioria dessas áreas não se presta ás culturas.

No Estado do Ceará as regiões algodoeiras visitadas limitaram-se ás visinhanças de Icó, «zona Jaguaribana», no sertão, e a Maracanahú, proximo de Fortaleza, que poderá ser considerada zona da mata.

No Pará foram inspecionados varios campos proximos de Igarapé-Assú, situados entre as cidades de Belém e Bragança, na «zona Bragantina», onde as condições de clima e solo não parecem das mais vantajosas para a cultura do algodoeiro.

NOTAS SOBRE OS PRINCIPAIS INSÉTOS PREJUDICIAIS AOS ALGODOEIROS

Gasterocercodes var. de *brasiliensis* HAMBL. — Dentre todos os insétos que atacam os algodoais nos Estados do Norte e Nordeste, não ha a menor duvida de que a bróca do algodoeiro ocupa o primeiro lugar.

Enquanto não se estabelecer até onde se distribue a especie *brasiliensis* HAMBL., o que não foi possivel determinar presentemente por pertencer todo o material colhido unicamente á variedade de que PYENSON (1938) trata nos seus trabalhos, considera-se ésta a unica que ocorre nequelas regiões.

E' certo, até agora, que a especie existente em S. Paulo extende a sua distribuição no Brasil desde o Estado de Paraná até o do Espirito Santo.

Os prejuizos causados por ela são mais pronunciados nas zonas onde se cultivam as variedades erbaceas, como por exemplo as regiões semelhantes á de Gloria de Goitá (Pernambuco) e Alagoinha (Paraíba), nas quais a temperatura e as condições do solo favorecem as atividades da bróca. As áreas destinadas ao algodão, nessas zonas, são mais extensas, e onde a rotação e as praticas profilaticas não são aplicadas, póde-se conceber que a infestação pela prága mantenha sempre um nivel mais elevado.

Nas diversas zonas percorridas nos diferentes Estados, a bróca do algodoeiro encontra-se difundida práticamente por todos os tipos de algodoais. E' isso tanto mais interessante quanto se considera que a zona do sertão, em vista das suas condições naturais e natureza perene da cultura algodoeira, não favorece a disseminação do inséto. Na zona do sertão os prejuizos pela bróca são mais intensos durante a primeira fase do seu desenvolvimento. Sendo plantado o algodão depois das chuvas fortes, coincide com o tempo em que a bróca tem uma atividade mais pronunciada.

Semeando uma quantidade maior de sementes e praticando o desbaste o mais tarde possivel, tal como se pratica em certas regiões onde a bróca constitue serio problema, são obtidos resultados bem satisfatórios na formação dos novos algodoais da variedade «mocó».

Si as plantas conseguem manter-se vivas durante o seu primeiro periodo de crescimento, só em raras ocasiões a sêca ou o ataque dessa prága, ou ambos conjuntamente, pódem determinar perdas severas ás culturas. Mas raro será que existam plantações de «mocó» de 4 ou 5 anos, que estejam isentas da prága. Nessa idade os ramos das plantas seriamente atacadas quebram-se facilmente, não sendo considerado economico cuidar de tais plantações por tempo mais extenso.

Na região de Seridó, no Rio Grande do Norte, o ataque pela bróca é aparentemente mais suave do que nas zonas semelhantes do sertão de Pernambuco e Paraíba. A variedade «mocó» produzida nessa região não parece, no entanto, mais resistente, e das observações feitas este ano não se obtiveram elementos capazes de explicar mais satisfatoriamente essa diferença de ataque ali verificada.

As condições da prága no Estado do Ceará são praticamente identicas ás observadas no sertão dos outros Estados já mencionados. Nas variedades erbaceas plantadas na parte norte do Estado, os prejuizos sempre se manifestam, sendo entretanto muito menos intensos do que se poderia supôr em vista de condições aí existentes.

No Pará, do exame procedido em campos isolados e muito separados um dos outros, notou-se que todos se encontravam infestados pela bróca. Contudo, devido a não terem sido esse ano favoraveis ás culturas as condições gerais, não se pôde formar melhor opinião quanto ao vulto dos prejuizos possivelmente verificados em outras ocasiões.

Tres inimigos naturais do *Gasterocercodes* foram observados no Nordeste, sendo bem distribuidos na zona da mata desses Estados. Mencionados na ordem de maior abundancia, são: *Heterospilus annulicornis* MUES., *Eurydinoteloides longiventris* GAHAN e *Heterospilus gossypii* MUES. Essas tres especies foram colhidas em Gloria de Goitá (Pernambuco) e Alagoinha (Paraíba).

Platyedra gossypiella SAUND. — Tal como a bróca, a lagarta rosada se encontra disseminada por todas as áreas algodoeiras visitadas, tendo-se verificado que os seus danos são mais pronunciados na zona da mata, onde as condições de clima são propicias a maior atividade dessa prága. Os prejuizos são geralmente mais sensiveis nos anos mais chuvósos. Quando visitámos a maioria dos algodoais da variedade erbacea, este ano, era cedo demais para se verificarem as perdas causadas pela lagarta, salvo nos casos em que ocasionalmente se observaram as infestações nas partes florais. A extensão dos prejuizos causados por unidade de área pela lagarta nessas regiões parece, porém, bem inferior ás dos verificados em zonas de S. Paulo mais ou menos semelhantes.

Na zona do sertão as condições de clima, tais como as temperaturas diarias muito elevadas, as quais comumente atingem 36º C. á sombra, longos periodos sêcos e ventos constantes, além de uma evaporação muito elevada, pódem sugerir que a sobrevivencia do inséto seja duvidosa. Apesar de estar submetida a essas condições, a lagarta rosada é observada e proporciona uma quantidade regular de perdas anuais, nunca muito sérias porém; só em áreas isoladas, quando ha uma abundancia de chuvas, esses danos se intensificam. E' muito possivel que maiores prejuizos se verifiquem na variedade «verdão», em Serra Verde (R. Grande do Norte), onde uma grande porcentagem de botões estavam atacados pela lagarta no mez de Setembro.

Do ponto de vista pratico, as medidas de combate aconselhadas contra a lagarta não pódem ser executadas com muito resultado naquelas regiões, devido á diferença nas épocas do plantio; na distribuição das chuvas, e á existencia das variedades perenes, nas quais a lagarta póde criar-se durante o ano. O expurgo das sementes para plantio é feito comumente, mas isso está longe de proporcionar visivel redução

da prága. Na zona da mata, porém, onde ha mais uniformidade na época de plantio, os processos indicados no combate á lagarta rosada poderão ser mais economicamente aplicadas, com possibilidades de melhor exito.

Os inimigos da lagarta encontrados distribuem-se por todas as zonas visitadas, até o Pará, e sem duvida contribuem para a redução dela, especialmente nas regiões do sertão. As especies seguintes, observadas com muita frequencia, são mencionadas pela ordem de importancia: *Microbracon vulgaris* (Ashm.), *Apanteles balthazari* (Ashm.), *Perisierola nigrifemur* (Ashm.) e *Spilochalcis simillima* (Ashm.).

Foram encontradas, especialmente nas zonas da mata e caatinga, as vespas depredadoras *Polybia atra* Sauss e *Polybia occidentalis scutellaris* (White).

Alabama argillacea Hübn. — O curuquerê é uma constante ameaça, especialmente durante o começo da estação chuvosa, em que comumente surge em tais proporções que as pulverizações arsenicais se tornam necessarias. Os prejuizos são geralmente mais sérios nas variedades erbaceas; na zona do sertão, nem sempre se evidenciam.

Em regra os algodoais são plantados em pequenas áreas nas zonas semi-aridas, separando-as, ás vêzes, distancias consideraveis. Desse modo, uma vez que o curuquerê seja combatido, ha poucas possibilidades de causar novamente, durante a mesma cultura, mais preocupações. No entanto, muitos pequenos lavradores, cujos campos são pouco cuidados, e principalmente si se localizam em regiões onde a agua é dificil, sempre que aparece o curuquerê têm muita dificuldade para o controlar satisfatoriamente. Sem duvida, devido a pulverizações inadequadas, as quais variam particularmente com relação á idade e tamanho dos algodoeiros arboreos, o seu combate nem sempre é eficaz, perdendo-se, por isso, muito algodão.

Chalcodermus bondari Marshall — Os estragos causados pelo «podador» foram observados em diversas ocasiões, especialmente nas regiões humidas de Pernambuco e Paraíba onde aparece distribuido mais fartamente sobre as variedades erbaceas. Apezar de sua ocorrencia comum, e das perdas resultantes do seu habito de podar, os lavradores dificilmente a consideram importante, não se preocupando em controlar esse curculionideo. Essa especie não foi vista na zona do sertão, excéto em uma ocasião em São Gonçalo, na Paraíba, onde o algodão erbaceo estava sendo submetido á irrigação. Possivelmente as áreas sêcas e quentes limitam a distribuição bem como os prejuizos proporcionados pelo «podador», nos Estados do Nordeste.

Oxycarenus hyalinipennis Costa — Uma das prágas do algodão mais comuns e frequentemente observada foi esta especie, cuja distribuição se extende por todas as zonas algodoeiras do paiz. Embora pouco conhecido nos Estados do Sul, no Norte, quem quer que tenha colhido algodão, terá tido o desprazer de se haver com esse inséto. No clima quente e sêco do sertão é ele encontrado em grandes quantidades, criando-se nas condições naturais sobre os capulhos, ou nos depositos onde o algodão é armazenado antes do beneficiamento. As fibras ficam sujas não só pelo escremento, mas tambem pelos corpos que são esmigalhados ou amaçados durante o tratamento do algodão. Os trabalhadores das usinas de beneficiamento são os mais incomodados com a presença dos adultos e ninfas, que caminham sobre o corpo, picam muitas vêzes, e têm um odor muito desagradavel. Pouco se conhece da biologia dessa especie no Norte do Brasil. As observações feitas em Vila Bela (Pernambuco), indicaram que a sua proliferação é muito rapida durante Agosto e Setembro, depois de um periodo de tres mêses sem chuvas, quando as temperaturas muito elevadas pareciam desfavoraveis ás formas imaturas desse inséto.

Gargaphia torresi Costa Lima — Este tingitideo do algodoeiro foi verificado em todos os Estados percorridos, infestando, além do algodão, meia duzia de outras plantas hospedeiras. Todas as variedades de algodão plantadas nas diferentes zonas estavam atacadas em identicas proporções. Os maiores prejuizos foram verificados no Rio G. do Norte, sobre a variedade «mocó». Quando chove menos as pequenas plantas são comumente tão atacadas que têm sido necessarias pulverizações com emulsão de sabão e kerosene, as quais dão certo resultado contra as ninfas dessa prága.

Aparentemente o algodoeiro é das plantas preferidas como hospedeiras dessa especie, embora ela seja tambem encontrada sobre outras plantas da mesma familia que crescem comumente proximas dos algodoais.

Aphis gossypii Glover — Este inséto foi visto na maioria dos algodoais do Norte, porém mais frequentemente na zona da mata, onde são mais propensos a determinar prejuizos. Varios coccinelideos, principalmente *Cycloneda sanguinea* L., *Ceratomegilla maculata* De Geer, *Scymnus limbaticollis* Muls. e *Hyperaspis festiva* Muls. são comuns, e a sua ação conjunta como predadores, além das estiagens desfavoraveis, é um fator importante na redução das infestações, a ponto de não resultar prejuizos evidentes, o que contribue para que nenhuma medida de combate seja julgada necessaria. Nas áreas quentes e sêcas os pulgões não têm nenhuma importancia sobre a variedade «mocó», sendo

mesmo, as vêzes, dificil encontrar qualquer indicação que comprove a sua presença.

Schistocerca australis SCUDDER. — Os gafanhotos são comumente observados, mas raramente em numero suficiente para proporcionar danos notaveis. Em Serra Verde, no Rio Grande do Norte, esta especie é uma prága que ocorre frequentemente, causando prejuizos ás variedades «mocó» e «verdão». São algumas vezes bastante numerosos, exigindo a aplicação de medidas de combate. Até presentemente, porém, nada se faz para os controlar.

A formiga saúva, *Atta sexdens* L., geralmente distribuida pela zona da mata e muito prejudicial á variedade erbacea, não é tão abundante nas regiões do sertão. Informaram-nos na Estação Experimental do Serviço de Plantas Texteis, em Bela Vista (Pernambuco) que a variedade «mocó» não é atacada por essa formiga.

PRÁGAS DE MENOR IMPORTANCIA DOS ALGODOAIS

Varias especies de homopteros foram encontradas nos algodoeiros das zonas percorridas. As mais frequentemente observadas foram as seguintes:

Pinnaspis minor MASK. — Essa cochonilha é comum nas variedades arboreas. Muitas vêzes os algodoeiros mais velhos ficam tão atacados, que muitos galhos morrem. Nas variedades erbaceas essa cochonilha raramente aparece de modo a determinar prejuizos apreciaveis.

Saissetia depressa TAR.-TOZZ. — Em certas ocasiões foi encontrada esta especie, tanto nas variedades arboreas como nas erbaceas. Sómente prejuizos leves resultam do ataque dessa cochonilha, visto que ela é encontrada comumente sobre individuos isolados.

Icerya sp. — Dois exemplares de uma especie ainda indeterminada foram achados na variedade «mocó» em Lima Campos (Ceará).

Phenacoccus gossypii (TWS. & CKLL.) — Varios algodoeiros erbaceos pouco desenvolvidos tinham as folhas levemente infestadas por esta especie, proximo de Fortaleza (Ceará). Este inséto não deve ser considerado prága importante, quer nos Estados do Norte, quer nos do Sul, onde é mais frequentemente encontrado.

Pseudococcus brevipes CKLL. — Em Gloria de Goitá (Pernambuco), esta especie foi colhida varias vêzes das raizes de algodoeiros erbaceos. Como a especie acima mencionada, parece ter grande distribuição sobre o algodão; no entanto seus prejuizos são muito suaves ou nenhuns.

Empoasca gossypii DeLong — Aparentemente esta especie não foi ainda considerada como prága do algodão no Brasil. A sua distribuição é comum a todos os algodoais. Essa cigarrinha apresenta-se em maior abundancia nos Estados do Sul, onde a sua alimentação prejudica o crescimento das folhas, provocando um enrolamento das margens, para baixo. Na zona da mata, de Pernambuco e Paraíba, é muito comum, não sendo as condições das regiões do sertão muito propicias ao seu desenvolvimento.

Cicadella sp. — Tambem fartamente distribuida, nunca ocorrendo, porém, em tão larga escala como a especie de *Empoasca.* Essa cigarrinha foi observada frequentemente tanto nas plantas de «mocó» como nas variedades erbaceas.

Cercopidae — Ninfas de um genero e especie desconhecida foram encontradas sobre algodoeiro arboreo em Pendencia (Paraíba), uma das regiões mais sêcas do Estado.

Relativamente poucas especies de hemipteros foram colhidas sobre algodão. Dentre elas mencionaremos as seguintes:

Dysdercus maurus Distant — Dos diversos manchadores conhecidos, esta especie foi vista alimentando-se das variedades erbaceas em Gloria de Goitá (Pernambuco) e S. Gonçalo (Paraíba), não sendo suficientemente numerosos para julga-la prejudicial.

Uma outra especie afim de *Dysdercus mimus* (Say) tambem foi encontrada sobre algodão em Igarapé-Assú (Pará). Essa mesma especie foi colhida sobre *Pavonia melacophilla* (Nees. & Mart.) Gurke, planta indigena da familia das Malvaceas, presentemente cultivada no Pará para a obtenção de fibra. O material de *Dysdercus* foi gentilmente identificado pelo dr. L. O. T. Mendes.

Edessa meditabunda Fab. — Na zona da mata foram colecionados varios exemplares deste pentatonideo, apanhados em diversas localidades sobre algodão.

Phthia ornata Ltl. — Em plantas de «mocó», em Cruseta (Rio Grande do Norte) e Vila Bela (Pernambuco), numerosos adultos deste coreídeo interessante foram encontrados agrupados nas folhas.

Essa especie foi primeiramente observada criando-se nas variedades erbaceas cultivadas em S. Paulo, nos anos de 1935-936, em Campinas, sendo ultimamente observada sobre *Althéa rosea* Cav.

Os Thysanopteros são comuns, existindo em grandes proporções, principalmente sobre as variedades erbaceas, nas regiões mais humidas. Nos algodoais de Gloria de Goitá, (Pernambuco) e S. Gonçalo, (Paraíba), onde a cultura é irrigada, verificou-se que 2 ou 3 especies per-

tencentes ao genero *Frankliniella* causavam danos, cuja verdadeira importancia não pôde ser avaliada.

O lepidoptero minador *Acrocercops helicometra* MEYRICK, cuja constatação foi primeiramente feita por BONDAR (1925) no Estado da Baía, distribue-se desde S. Paulo até o Pará. Foi notado nos algodoais de muitas regiões sêcas do sertão de Ceará, R. Grande do Norte, Paraíba e Pernambuco.

Cteisa hirta SOL. — Numerosos exemplares deste cistelideo foram observados nos campos algodoeiros de Correntes (Pernambuco) e Alagoinha (Paraíba). Em São Paulo as larvas dessa especie alimentam-se das raizes, causando frequentemente grandes prejuizos ao algodão recém-nascido. Pódem ser confundidas facilmente com as larvas de certos elaterideos.

Phasmidae — Ninfas de genero e especie desconhecidas eram muito comuns no algodão «mocó», em Pendencia (Paraíba), onde foram encontradas alimentando-se da folhagem.

Tres especies de ácaros foram vistas atacando os algodoeiros. Destes o *Tetranychus bimaculatus* HARVEY, recentemente constatado por PYENSON (1938) em Pernambuco, é o mais comum. Praticamente todos os algodoais percorridos na zona da mata, desde Pernambuco até Pará, estavam infestados, variando o gráo de infestação com a idade das plantas e as condições climaticas. Não foi observado nenhum caso em que perdas vultosas tivessem sido provocadas por essa especie. No sertão, as variedades arboreas não estavam atacadas.

O ácaro tropical *Tarsonemus latus* BANKS, recentemente considerado por HAMBLETON (1938) como agente causador da rasgadura das folhas dos algodoeiros em S. Paulo, foi erradamente suposto desconhecido no Brasil. Todo o credito deverá ser dado a BONDAR (1930), que primeiramente observou seus estragos sobre feijão manteiga *(Phaseolus lunulatus* L.), na Baía. As observações feitas extendem agora a sua distribuição aos Estados de Pernambuco e Ceará. Seus danos foram notificados em algodoeiros «mocó» de um ano de idade, em Vila Bela, no sertão de Pernambuco, e em um unico pé de pimentão, em Fortaleza (Ceará).

A especie causadora de galhas *Eriophyes gossypii* BANKS, tambem já constatada por BONDAR (1924) na Baía, foi observada provocando serios danos, á variedade «mocó» unicamente, na zona agreste, região fria e seca, proximo de São Bento (Pernambuco).

OBSERVATIONS ON COTTON PESTS OF NORTHERN AND NORTHEASTERN BRAZIL

Abstract

A brief account of the more important and injurious pests of the cotton plant in northern and northeastern Brazil is given. In order to understand the unusual conditions under which cotton insects are at work in that part of the country, some general features of climate, topography and cotton growing are outlined. Control measures of several pests are discussed and notes included on others of less importance.

BIBLIOGRAFIA

1 — Bondar, G. — 1924 — Relatorio sobre diversas culturas. *Bol. do Lab. Pat. Veg.*, Baía, n.º 1: 33 pp., figs.

2 — Bondar, G. — 1926 — Relatorio sobre diversas culturas. *Bol. do Lab. Pat. Veg.*, Baía, n.º 3: 97 pp., figs.

3 — Bondar, G. — 1930 — Insétos daninhos e molestias dos feijões na Baía. *Bol. do Lab. Pat. Veg.*, Baía, n.º 9: 83 pp., figs.

4 — Hambleton, E. J. — 1937 — A bróca do algodoeiro do Brasil, Gasterocercodes brasiliensis Hambl., *Arq. Inst. Biol.*, S. Paulo, 8, 47-106, figs.

5 — Hambleton, E. J. — 1938 — A ocorrencia do ácaro tropical Tarsonemus latus Banks, causador da rasgadura das folhas nos algodoais de S. Paulo. *Arq. Inst. Biol.*, S. Paulo, 9, 201-209, figs.

6 — Iglesias, F. — 1916 — Insétos nocivos e uteis ao algodoeiro. *Bol. de Agr. de S. Paulo*, 17 (12): 968-978, figs.

7 — Lima, A. da Costa — 1918 — *A lagarta rosea do capulho.* Imprensa Nacional, Rio de Janeiro, 55 pp., figs.

8 — Lima, A. da Costa — 1928 — Relatorio sobre a doença dos cafeeiros em Pernambuco. *Sec. Agr. Com. Ind. Via.* e *Obr. Pub. Recife*, Pernambuco, 27 pp.

9 — Pyenson, L. — 1938 — The problems of applied entomology in Pernambucô. Part I, *Rev. de Ent.*, Rio de Janeiro, 8, 237-254, figs.

10 — Pyenson, L. — 1938 — The problems of applied entomology in Pernambuco. Part II, *Rev. de Ent.*, Rio de Janeiro, 9, 16-31.

11 — Pyenson, L. — 1938 — Notes on the biology of the cotton borer in Pernambuco, Brazil. *Jour. Eco. Ent.*, 31, 553-557, figs.

———o———

SÃO PAULO
TIPOGRAFIA BRASIL
ROTHSCHILD & CIA.
R. 15 NOVEMBRO, 201
1938